

Marcos André Schörner

**Estudo caso-controle dos aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na área de concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Co-orientadora: Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schörner, Marcos André

Estudo caso-controle dos aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC / Marcos André Schörner ; orientadora, Maria Luiza Bazzo ; coorientadora, Thais Cristine Marques Sincero. - Florianópolis, SC, 2016.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Estudo caso-controle. 3. Fatores de risco. 4. *Klebsiella pneumoniae*. 5. Infecção nosocomial. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Sincero, Thais Cristine Marques. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente à minha família, minha querida mãe, Dirce e meus irmãos Silvana e Everaldo, que nos piores momentos me fizeram acreditar que os sonhos são possíveis e nunca desistir deles. Sou eternamente grato pela educação durante todos esses anos que me guiou ao que sou hoje. Obrigado por tudo o que fizeram e fazem por mim, amo vocês.*

*Pai... nunca me esquecerei dos teus ensinamentos, das tuas palavras sinceras e do seu carinho. Pode ter certeza de que eles foram e estão sendo minha base para vencer novos desafios na vida.*

*Aos meus amigos de graduação, agradeço por me proporcionarem momentos inesquecíveis. Foram muitas noites em claro estudando para provas e em festas. Junto com vocês me tornei uma pessoa melhor e mais preparada.*

*Aos meus amigos do laboratório, Álisson, Cynthia, Duda, Eduardo, Felipe, Hana, Letícia, Lica, Malu, Márick, Paula, Renata, Prim, Taiane, Thais. Obrigado a todos pelo conhecimento compartilhado que acrescentou em minha formação e por toda ajuda nos momentos mais difíceis. Estarei à disposição de todos a qualquer momento para tudo que precisarem.*

*Agradeço à professora Maria Luiza Bazzo, por ter me dado a oportunidade em 2010 de participar de seu grupo de pesquisa e por todos esses anos que trabalhamos juntos. Agradeço também por todas as oportunidades que surgiram durante esse tempo, as quais você me confiou e que ajudaram a consolidar meus conhecimentos. Parte da minha formação com certeza se deve a sua imensa dedicação comigo e com seus alunos.*

*À Professora Thaís Cristine Marques Sincero, por todo o apoio prestado e contribuição como Co-orientadora do trabalho. Agradeço também ao Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) e à Daniela Tartari pelo suporte para realização da técnica PFGE.*

*À Mara Cristina Scheffer pela valiosa contribuição no estudo com sua vasta experiência na área de microbiologia. Sua dedicação e paciência foram fundamentais para realização do trabalho. Agradeço também todo o pessoal do Setor de Microbiologia da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC.*

*À Professora Rosemeri Maurici pela participação no grupo de estudo deste projeto, como coordenadora do recurso Fapesc e por todo o auxílio na execução da estatística do estudo.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e todo seu corpo docente pelo apoio e conhecimentos partilhados.*

*Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho e por terem acreditado em mim desde o início. Espero poder retribuir para a sociedade tudo o que aprendi.*

**OBRIGADO!**

## **FONTES FINANCIADORAS**

O estudo recebeu financiamento pelo Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS), e bolsa de mestrado pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão Universitária – FAPEU.



## RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos por *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), principalmente em *K. pneumoniae*, representa um grave problema para o manuseio de infecções adquiridas no ambiente hospitalar. Carbapenêmicos, considerados a “última linha de defesa” para diversos tipos de infecção por bactérias Gram-negativas, tornam-se ineficientes contra bactérias produtoras de carbapenemases, e poucos antibióticos estão disponíveis atualmente para o tratamento. O presente estudo caso-controle pareado, teve por objetivo identificar aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC (Kp-KPC) em pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) no período de Janeiro de 2012 a Dezembro de 2014. A identificação dos isolados e o antibiograma foram realizados por metodologia automatizada (Vitek 2®/Biomerieux). Foram utilizados dois testes fenotípicos, em diferentes momentos do estudo, para triagem dos isolados com resistência aos carbapenêmicos. Todos os isolados foram confirmados por metodologia molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR). Foram selecionados para o grupo caso 40 pacientes com Kp-KPC e para o grupo controle 40 pacientes com *K. pneumoniae* não produtora de carbapenemase do tipo KPC (Kp-não-KPC) isoladas de amostras de urina e hemocultura. Dados obtidos incluíram a origem do paciente no momento da internação, fatores de risco, como tempo de hospitalização antes da infecção, admissão em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) antes do isolamento de *K. pneumoniae*, cirurgia, presença de dispositivos invasivos, uso prévio de antibióticos, tratamento empírico e definitivo, bem como comorbidades e desfecho clínico dos pacientes. Os dados foram coletados dos prontuários. A maioria dos pacientes transferidos para o HU/UFSC de outros hospitais pertencia ao grupo caso ( $P=0,010$ ). Isso destaca a necessidade de realização de culturas de vigilância para pacientes transferidos para o HU/UFSC. Neste estudo, a admissão na UTI (Razão de Chance [RC], 3,115; Intervalo de Confiança [IC] 95%, 1,247-7,781;  $P=0,014$ ), presença de cateter venoso (RC, 5,516; IC 95%, 1,109-27,429;  $P=0,023$ ), presença de cateter urinário (RC, 3,484; IC 95%, 1,246-9,747;  $P=0,015$ ) e uso prévio de antibióticos (RC, 3,444; IC 95%, 1,310-9,058;  $P=0,011$ ) foram associados a infecções por Kp-KPC por análise univariada. Quando analisados os antibióticos ou as classes mais comumente utilizadas, foi encontrada diferença significativa para o grupo caso no uso de cefalosporinas de

amplo espectro ( $P=0,039$ ). A análise da terapia empírica mostrou que 71,4% dos pacientes que não a utilizaram foram a óbito. Dentre os pacientes que fizeram uso de terapia empírica, a mortalidade foi maior para os pacientes que receberam terapia apropriada (58,3% vs 37,5%). Após o resultado do antibiograma, a mortalidade foi maior para os pacientes que receberam terapia apropriada (55% vs 50%). Além disso, verificou-se que a mortalidade de quem fez uso de terapia definitiva combinada (70%) foi maior do que pacientes que utilizaram monoterapia (40%). A frequência da mortalidade total foi significativamente maior para o grupo caso (47,5% vs 25%,  $P=0,036$ ). O número crescente de isolados, tanto em amostras clínicas quanto em culturas de vigilância, alerta para a necessidade de aprimoramento das medidas já adotadas a fim de controlar a disseminação do microrganismo no HU/UFSC. Cateteres venoso e urinário foram associados com infecções por Kp-KPC, por isso em internações mais longas, esses dispositivos devem ser revistos regularmente para verificar se ainda são necessários. Kp-KPC é um patógeno emergente associado à mortalidade no HU/UFSC. A frequência da mortalidade associada às limitadas opções terapêuticas ressalta a necessidade de detecção precoce, de medidas de prevenção de contato e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessas infecções.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*, KPC, fatores de risco, estudo caso-controle pareado, infecção nosocomial, mortalidade, vigilância.



## ABSTRACT

### **Case-control study of clinical features, risk factors and mortality associated with nosocomial infections by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae***

The bacterial resistance to antimicrobials by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), especially in *Klebsiella pneumoniae*, is a serious problem to handling healthcare associated infections. Carbapenems, considered the “last-line agents” to treat several infections by Gram-negative bacteria become ineffective against carbapenem-producing bacteria, and few effective antibiotics are currently available to treatment. To identify clinical aspects, risk factors and mortality associated to infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae* (Kp-KPC), this matched case-control study was performed at the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina (HU/UFSC) from January 2012 through December 2014. The bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed by automatized methodology (Vitek 2®/Biomérieux). Two phenotypic tests were performed in different moment to screening the isolates with carbapenems resistance. All isolates were confirmed by molecular methodology (Polimerase Chain Reaction - PCR). Were selected isolates from urine and blood culture of forty patients with Kp-KPC (case) and forty patients with non-KPC-producing *K. pneumoniae* (Kp-non-KPC). Data obtained included origin of patient at the time of hospital admission, risk factors such as length of stay before infection, Intensive Care Unit (ICU) stay prior to *K. pneumoniae* isolation, surgery, use of invasive devices, prior antibiotic therapy, empiric therapy and definitive treatment, as well as comorbidities and outcomes. Data were collected from medical charts. Most of transferred patients to HU/UFSC from others hospitals belonged to case group (P=0.010). This highlight the need of surveillance cultures to patients transferred to HU/UFSC. In this study, stayed in ICU, (Odds Ratio [OR], 3.115; Confidence Intervals [CI] 95%, 1.247-7.781; P=0.014), use of venous catheter (OR, 5.516; CI 95%, 1.109-27.429; P=0.023), use of urinary catheter (OR, 3.484; CI 95%, 1.246-9.747; P=0.015) and prior antimicrobial use (OR, 3.444; CI 95%, 1.310-9.058; P=0.011) were associated with Kp-KPC infections by univariable analysis. The analysis of the antibiotics or class of antibiotics most commonly used, showed significant difference to case group for the use of extended-spectrum cephalosporins (P=0.039). The analysis of empirical therapy showed that 71.4% of patients who did not use empiric antibiotic died. Among

patients who used empirical therapy, mortality was higher for patients who received appropriate therapy (58.3% vs 37.5%). After antimicrobial susceptibility testing, mortality was higher for patients who received appropriate therapy (55% vs 50%). Furthermore, it was found that mortality of patients who received definitive associated therapy (70%) was higher than patients who used monotherapy (40%) ( $P=0.370$ ). The mortality frequency was significant higher for case group (47.5% vs 25%,  $P=0.036$ ). The increase number of isolates, both in clinical samples and surveillance cultures, alert to the need to improve the measures already adopted in order to control the spread of the microorganisms in HU/UFSC. Venous and urinary catheters were associated with Kp-KPC infections, so in long-stay hospitalizations, these devices should be reviewed regularly to check whether they are still needed. Kp-KPC is an emerging pathogen associated with significant mortality in HU/UFSC. The mortality frequency associated with limited therapeutic options, highlight the need of early detection, contact prevention measures and development of new drugs for the treatment of these infections.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, KPC, risk factors, matched case-control, nosocomial infection, mortality, surveillance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. PCR para detecção de KPC utilizando-se iniciadores específicos para o gene bla <sub>KPC</sub> .....	52
Figura 3. 3A - Total de amostras identificadas como Kp-KPC por sítio de coleta no período de estudo no HU/UFSC. 3B - Total de amostras Kp-KPC incluídas no estudo caso-controle.....	53
Figura 2. Número de isolados e de pacientes identificados com Kp-KPC no HU/UFSC entre 2012 e 2014. ....	53
Figura 4. Variação do tempo de hospitalização entre os grupos caso e controle.....	57
Figura 5. Distribuição de casos e controles nas Unidades de Internação no momento da coleta da amostra. ....	60
Figura 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para meropenem de acordo com o sítio anatômico de coleta dos isolados Kp-KPC.....	63
Figura 7. Isolados de Kp-KPC testados pela técnica PFGE.....	66



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Beta-lactamases.....	28
Tabela 2. Características dos pacientes, sítio anatômico e data do resultado do isolamento das bactérias caso e controle. ....	54
Tabela 3. Associação entre os grupos em relação à origem do paciente no momento da admissão no HU/UFSC. ....	56
Tabela 4. Associação dos grupos e os fatores de risco de infecção analisados no estudo caso-controle. ....	58
Tabela 5. Razões de Chance para os fatores de risco que apresentaram diferença significativa entre os grupos.....	59
Tabela 6. Associação dos grupos e as comorbidades analisadas no estudo caso-controle.....	60
Tabela 7. Associação entre os grupos e os antibióticos utilizados antes da positividade da amostra e Razão de Chance.....	61
Tabela 8. Associação entre os grupos e os antibióticos mais utilizados antes da positividade da amostra e RC.....	62
Tabela 9. Associação entre os grupos e o desfecho dos pacientes incluídos no estudo caso-controle. ....	65



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AFB</b>	Ácido Fenilborônico
<b>BHI</b>	<i>Brain-Heart Infusion Broth</i> (Caldo Infusão de Cérebro e Coração)
<b>CCIH</b>	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisas
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CM</b>	Clínica Médica
<b>CRE</b>	<i>Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae</i> ( <i>Enterobacteriaceae</i> resistente aos carbapenêmicos)
<b>dNTP</b>	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i> (Deoxiribonucleosídeo Trifosfato)
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiaminotetracético)
<b>EGM</b>	Elemento Genético Móvel
<b>ESBL</b>	<i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i> (Beta-lactamase de Espectro Estendido)
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
<b>HU/UFSC</b>	Hospital Universitário/Universidade Federal de Santa Catarina
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>ITU</b>	Infecção no Trato Urinário
<b>kb</b>	quilo bases (mil pares de base)
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
<b>Kp-KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase do tipo KPC
<b>Kp-não-KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> não produtora de carbapenemase do tipo KPC
<b>Kp-RC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistente aos Carbapenêmicos
<b>MDR</b>	<i>Multidrug-Resistant</i> (Resistência a múltiplos fármacos)
<b>MHT</b>	<i>Modified Hodge Test</i> (Teste de Hodge Modificado)
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>NDM</b>	Nova Delhi metalo-beta-lactamase
<b>pb</b>	pares de base
<b>PBP</b>	<i>Penicillin-Binding Proteins</i> (Proteínas ligadoras de penicilina)
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfatos)
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de campo pulsado)
<b>RC</b>	Razão de Chance
<b>ST</b>	<i>Sequence Type</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borato EDTA

<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TOT</b>	Tubo Oro-Traqueal
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UNISUL</b>	Universidade do Sul de Santa Catarina
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b><math>x g</math></b>	Força gravitacional



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
2.1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE – ESPÉCIE E GÊNERO .....	25
2.2. ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS .....	25
2.3. BETA-LACTAMASES .....	26
<b>2.3.1. Definição e classificação .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2. Ação das beta-lactamases .....</b>	<b>29</b>
2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS .....	29
2.5. CARBAPENEMASES .....	29
<b>2.5.1. Carbapenemase do tipo KPC .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.2. Detecção de carbapenemases – fenotípica e molecular .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.3. Epidemiologia e histórico de KPC .....</b>	<b>33</b>
2.6. CULTURAS DE VIGILÂNCIA .....	35
2.7. PULSED-FIELD GEL ELETROPHORESIS (PFGE) .....	35
2.8. TRATAMENTO .....	36
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVO .....</b>	<b>41</b>
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	41
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
5.1. LOCAL E ASPECTOS ÉTICOS .....	43
5.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	43
5.3. TIPOS DE ESTUDO E AMOSTRAGEM .....	43
5.4. CULTURAS .....	43
<b>5.4.1. Culturas de Vigilância .....</b>	<b>43</b>
5.5. TRIAGEM E TESTES FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES .....	44
<b>5.5.1. Teste de Hodge Modificado (MHT) .....</b>	<b>44</b>
<b>5.5.2. Teste com Inibidores e Potenciador Enzimáticos .....</b>	<b>44</b>
5.6. TESTE MOLECULAR CONFIRMATÓRIO PARA CARBAPENEMASES .....	45
5.7. ESTUDO CASO-CONTROLE .....	46
<b>5.7.1. Calculo Amostral.....</b>	<b>46</b>
<b>5.7.2. Análise dos Prontuários Médicos.....</b>	<b>46</b>

<b>5.7.3. Critérios de Exclusão .....</b>	<b>47</b>
<b>5.7.4. Dados dos pacientes .....</b>	<b>47</b>
<b>5.7.5. Análise Estatística dos resultados .....</b>	<b>48</b>
<b>5.8. ESTUDO DE CLONALIDADE DOS ISOLADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>5.8.1. Preparação dos Blocos com DNA .....</b>	<b>49</b>
<b>5.8.2. Clivagem do DNA com Enzima de Restrição .....</b>	<b>49</b>
<b>5.8.3. Eletroforese em Gel de Agarose.....</b>	<b>50</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é retrato de um complexo problema com potenciais consequências catastróficas. Novas formas de resistência cruzam as fronteiras internacionais e disseminam-se com facilidade e velocidade impressionantes. Em publicação baseada em suposições conservadoras, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention/EUA*) estima que mais de dois milhões de pessoas adoecem a cada ano nos Estados Unidos da América (EUA) com infecções por microrganismos resistentes, com pelo menos 23.000 mortes em decorrência direta destas infecções. Infecções por microrganismos resistentes requerem tratamentos prolongados e onerosos, aumentando o tempo de internação e a mortalidade. Nos EUA, a resistência aos antimicrobianos tem um aumento estimado no custo para o sistema de saúde de cerca de 20 bilhões de dólares/ano, com um custo adicional para a sociedade por perda de produtividade de aproximadamente 35 bilhões de dólares/ano. Nesse contexto, o CDC classificou as bactérias quanto ao nível de preocupação em três categorias: urgente, séria e preocupante. Na categoria urgente, citam *Clostridium difficile*, enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE) e *Neisseria gonorrhoeae* droga-resistente. Essas constituem ameaças com grande potencial de disseminação, necessitando atenção urgente para identificar as infecções e limitar sua transmissão (ROBERTS et al., 2009; CDC, 2013).

A emergência de resistência aos carbapenêmicos representa um grande problema para o manuseio de infecções adquiridas no ambiente hospitalar, visto que esses beta-lactâmicos de amplo espectro são considerados o último recurso para tratamento de infecções graves por gram-negativos (CDC, 2013). Em *Enterobacteriaceae*, a produção de carbapenemases, enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos, é extremamente preocupante, devido a sua localização em plasmídios e consequente rápida disseminação. Inicialmente reportada nos EUA, na Carolina do Norte em 1996 (YIGIT et al., 2001), a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) se disseminou por todos os continentes. Na América do Sul, o primeiro relato ocorreu na Colômbia em 2005 (VILLEGAS et al., 2006). No Brasil, os primeiros isolados foram reportados em Recife (2006) e Rio de Janeiro (2007) (MONTEIRO et al., 2009; PEIRANO et al., 2009) e atualmente, KPC tornou-se a mais importante carbapenemase. Segundo dados do SENTRY (Programa mundial de vigilância de resistência a antimicrobianos/*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*), houve

um aumento significativo no número de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC em 2010 no Brasil, passando de 10 isolados em 2009 para 44 em 2010 (GALES et al., 2012). No Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), o primeiro isolado foi relatado em janeiro de 2012, em *Escherichia coli* recuperada de infecção de trato urinário de paciente submetida a transplante hepático e previamente hospitalizada em outra cidade (SCHÖRNER et al., 2013).

A disseminação de carbapenemases tem sido historicamente associada à transferência de pacientes entre hospitais, bem como ao deslocamento de profissionais entre instituições de saúde (NAAS et al., 2005; WOODFORD et al., 2008; BOGAERTS et al., 2010; HAMMERUM et al., 2010; CARBONNE et al., 2010). KPC confere diminuição de sensibilidade ou resistência a virtualmente todos os beta-lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) podem tornar-se ineficientes para tratamento de infecções por Enterobactérias produtoras de KPC, restando poucas opções terapêuticas disponíveis. Isso resulta em infecções intratáveis ou de difícil tratamento, que estão em ascensão entre os pacientes internados nas diversas instituições de saúde. A diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos não é suficiente para determinar a presença de KPC, ou de outras carbapenemases. Testes fenotípicos são utilizados nos laboratórios de microbiologia com fins epidemiológicos para determinar se a resistência deve-se a presença de carbapenemases ou devido a outros mecanismos, como superexpressão de AmpC plasmidial e beta-lactamases de espectro estendido somado a alterações de permeabilidade. O teste de Hodge modificado (MHT, do inglês *Modified Hodge Test*) foi amplamente utilizado nos laboratórios de rotina, com bons resultados de sensibilidade e especificidade para isolados de *K. pneumoniae* resistentes ao ertapenem por produção de KPC (CURY et al., 2012; SCHÖRNER et al., 2013). Atualmente, devido ao isolamento de Nova Deli metalo-beta-lactamase (NDM) no Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2013), a utilização do MHT foi desaconselhada na rotina laboratorial por não ter sensibilidade para detectar a nova carbapenemase que começa a circular. Nesse sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Nota Técnica Nº 01/2013, a qual descreve medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multirresistentes e padroniza nos laboratórios brasileiros o teste fenotípico que utiliza inibidores enzimáticos (EDTA como inibidor de metalo-beta-lactamase e ácido fenilborônico como inibidor de KPC) e potenciador enzimático (cloxacilina como inibidor de AmpC plasmidial que potencializa a ação

do carbapenêmico). O teste fenotípico com ácido fenilborônico tem uma especificidade de 99% para KPC em isolados de *K. pneumoniae* (ANVISA, 2013).

Nos hospitais em que houve descrição de casos de carbapenemases, a ANVISA recomenda a realização de culturas de vigilância para detectar portadores gastrointestinais de KPC, pois eles são reservatórios que facilitam a disseminação por transmissão cruzada. A amostra utilizada para cultura de vigilância é o swab retal, que deve ser incubado em caldo com disco de ertapenem e posteriormente semeado em ágar MacConkey com discos de ertapenem, as colônias que crescerem dentro do halo de 27 mm ao redor do ertapenem devem ser submetidas ao teste fenotípico para carbapenemases (ANVISA, 2013). O padrão áureo para confirmação da presença de carbapenemases é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*). As sequências para os genes *bla*<sub>KPC</sub> podem ser encontradas na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Entre os tipos de KPC descritos, a carbapenemase KPC-2 é a mais comum. Diferenças na sequência de aminoácidos resultam em diferentes tipos de enzimas, que podem apresentar eficiência hidrolítica diferenciada (SILVA; TRAEBERT; GALATO, 2012).

Em revisão sobre aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *K. pneumoniae* produtoras de KPC (Kp-KPC), Silva e colaboradores (2012) caracterizaram os pacientes como sendo a maioria homens de idade avançada, com comorbidades, e com exposição prévia a antimicrobianos. A utilização prévia de fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro aparece como fator de risco independente para *K. pneumoniae* produtora de Kp-KPC (GASINK et al., 2009). Analisando somente isolados de bacteremia por Kp-KPC, Tuon e colaboradores (2012) descreveram como principais fatores de risco associados à KPC a idade do paciente e a utilização de ventilação mecânica, destacando-se ainda a exposição à fluoroquinolona durante a hospitalização. A identificação dos fatores de risco associados à infecção por microrganismo multirresistente auxilia no entendimento dos determinantes de disseminação do patógeno e na tomada de decisão sobre a melhor terapia antimicrobiana empírica em infecções graves, a qual é crítica para o desfecho (KANG et al., 2005).

Segundo o CDC (2013), as estratégias para o enfrentamento deste problema devem incluir quatro ações fundamentais: prevenção de infecções e de disseminação da resistência, monitoramento da resistência, prescrição apropriada de antimicrobianos e desenvolvimento de novos fármacos. A prevenção de infecções segue as recomendações

de precauções padrão do controle de infecção para todos os pacientes e utilização de precauções de contato para pacientes com CRE (sempre que possível dedicar quartos, equipamentos e pessoal especializado aos pacientes com CRE). O monitoramento inclui estudos dos casos, com determinação de fatores de risco e determinantes de disseminação, culturas com determinação dos perfis de sensibilidade e confirmação dos mecanismos de resistência. A prescrição apropriada de antimicrobianos garante que todas as prescrições tenham dose, duração e indicação apropriadas. A realização de culturas antes de iniciar o antimicrobiano, reavaliação do paciente após 48 a 72 h da utilização do antimicrobiano e a remoção de dispositivos médicos temporários assim que possível também são medidas que auxiliam o monitoramento dos pacientes (SIEGEL et al., 2007; CDC, 2013).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE – ESPÉCIE E GÊNERO

O gênero *Klebsiella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*, a qual é constituída de microrganismos ubíquos encontrados em todo o mundo no solo, água, vegetais e como parte da microbiota normal da grande maioria dos animais, inclusive de seres humanos (HANSEN; GOTTSCHAU; KOLMOS, 1998; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Este gênero é definido por conter bacilos Gram-negativos, imóveis e usualmente produtores de cápsula polissacarídica, que constitui um dos principais fatores de virulência. Foi descrito pela primeira vez por Trevisan em 1885 e designado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Kleb, o qual dois anos mais tarde descreveu a espécie *Klebsiella pneumoniae* (MARTÍNEZ et al., 2004).

Dentre as 14 espécies do gênero *Klebsiella* descritas até o momento (EUZÉBY, 1997), *K. pneumoniae* é a que apresenta a principal relevância clínica, sendo responsável por mais de 70% das infecções causadas por bactérias desse gênero. Nos humanos, é isolada como constituinte da microbiota normal no trato gastrointestinal, pele, nasofaringe e orofaringe, sem causar qualquer tipo de doença. Embora faça parte da microbiota, é agente causador de uma série de doenças adquiridas na comunidade, incluindo pneumonia, oftalmite endógena, infecções de tecido mole e meningite. Em ambiente hospitalar, tem sido mais comumente isolada em infecções no trato urinário (ITU), trato respiratório e infecções associadas à corrente sanguínea (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; DAIKOS et al., 2012; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

### 2.2. ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS

Os antibióticos beta-lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos – representam 60% de todos os antimicrobianos utilizados. Nenhuma outra classe de antibióticos possui tanta versatilidade. A preferência pelo seu uso deve-se a sua eficácia e segurança e porque sua atividade pode ser estendida ou restaurada por manipulação química. Toda a classe dos antibióticos beta-lactâmicos atua inibindo a transpeptidase D-ala-D-ala e a atividade de carboxipeptidase das enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana. Essas enzimas são conhecidas como proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs, do inglês *penicillin-binding-proteins*) e

são responsáveis por catalisar a síntese das ligações cruzadas para formação do peptidoglicano reticular, a partir da remoção de D-alanina do precursor do peptidoglicano. Quando não há formação dessas ligações, ocorre lise da parede celular mediada por autolisinas, levando a morte bacteriana (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Dentre os diferentes antibióticos beta-lactâmicos, os carbapenêmicos são os que possuem o mais amplo espectro de ação e a mais alta potência contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Por essa razão, são considerados por muitos autores como “antibióticos de última linha” e utilizados quando os pacientes tornam-se gravemente doentes por uma infecção ou quando se suspeita de infecções por bactérias multirresistentes, incluindo bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (PATERSON; BONOMO, 2005; PAPP-WALLACE et al., 2011). Até recentemente surgirem os primeiros casos de resistência a esses antibióticos, os carbapenêmicos vinham sendo utilizados com sucesso no tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae*, incluindo por microrganismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamase*) (VARDAKAS et al., 2012; FALAGAS et al., 2014).

## 2.3. BETA-LACTAMASES

### 2.3.1. Definição e classificação

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar amidas, amidinas e pontes carbono-nitrogênio (C-N), quebrando o anel beta-lactâmico (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995). Dentre os diversos mecanismos de resistência aos antibióticos, a produção de beta-lactamases é o mais comum e de maior importância em bactérias Gram-negativas (BUSH; JACOBY, 2010). É uma família de enzimas amplamente distribuídas entre as bactérias, podendo ocorrer tanto em bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas. Segundo Ambler (1980), a quantidade de enzima produzida por bactérias Gram-negativas é pequena, mas sua concentração no espaço periplasmático é elevada, melhorando seu desempenho.

Essas enzimas possuem uma grande variação em suas propriedades enzimáticas e na sua estrutura molecular. Diferentes tipos de beta-lactamases possuem diferentes perfis de atividade hidrolítica frente aos beta-lactâmicos (AMBLER, 1980). Dessa forma, vários esquemas foram propostos para a classificação das beta-lactamases e,



atualmente, dois deles são os mais utilizados. O primeiro, baseado na estrutura molecular das enzimas, divide as beta-lactamases nas classes A, C e D, as quais possuem um aminoácido serina em seu sítio ativo, e classe B, que requer um íon de zinco divalente como substrato para hidrólise (AMBLER, 1980). O segundo esquema é baseado na classificação funcional e leva em conta o perfil de inibição, o substrato utilizado pela enzima, a massa molecular e o ponto isoelétrico. Esta classificação divide as beta-lactamases em quatro grupos (1, 2, 3 e 4). Esse segundo esquema foi atualizado em 2010 com a adição de novas sequências de peptídeos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOBY, 2010; PHILIPPON et al., 2015).

Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos são utilizados com muita frequência nos regimes de tratamento de diversas doenças infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas. Por isso, a presença e a característica das beta-lactamases têm um papel crítico na seleção da terapia antimicrobiana (BUSH; JACOBY, 2010).

**Tabela 1-Classificação das Beta-lactamases.**

Classe Funcional	Classe Molecular	Principais Substratos	Inibição por		Principais Enzimas
			AC ou TZB <sup>a</sup>	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC, CMY-2
2a	A	Penicilinas	+	-	PC1
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10
2c	A	Carbenicilina	+	-	CARB-3
2d	D	Cloxacilina	Variável	-	OXA-1, OXA-10
2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	+	-	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	Variável	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3	B	Carbapenêmicos	-	+	IMP-1, VIM-1, NDM-1

<sup>a</sup>AC, Ácido Clavulânico; TZB, Tazobactam.

Adaptado de Bush; Jacoby; Medeiros, 1995 e Bush; Jacoby, 2010.

### 2.3.2. Ação das beta-lactamases

As beta-lactamases são capazes de catalisar a hidrólise do anel beta-lactâmico ligando-se ao antibiótico e formando um complexo não covalente. O anel beta-lactâmico é atacado por uma hidroxila livre de um resíduo de serina, obtendo-se uma ligação acil-éster. A hidrólise desse éster acaba separando a ligação da enzima com o antibiótico, deixando-o inativo. Esse mecanismo ocorre com as beta-lactamases das classes A, C e D por serem serino-beta-lactamases. A classe B de enzimas necessita de um íon de zinco para atacar o anel beta-lactâmico (LIVERMORE, 1995).

### 2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

Bactérias produtoras da enzima KPC são na maioria das vezes susceptíveis a poucos antibióticos, gerando altos índices de mortalidade principalmente em pacientes com infecções sanguíneas. Muitas bactérias produtoras dessa enzima permanecem susceptíveis apenas a colistina, tigeciclina e poucos aminoglicosídeos (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

Em *K. pneumoniae*, a resistência aos carbapenêmicos está ligada à diferentes mecanismos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). A diminuição na permeabilidade da membrana bacteriana associada com a produção de beta-lactamases que possuem uma atividade fraca para hidrólise de carbapenêmicos podem reduzir a susceptibilidade aos mesmos, principalmente ao ertapenem (GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2009). Essas enzimas podem ser da classe A de Ambler, como ESBP, ou ainda da classe C de Ambler (AmpC) (NORDMANN; MAMMERI, 2007; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Diferentemente desses mecanismos que envolvem outras beta-lactamases, as carbapenemases são responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos mesmo sem um mecanismo de resistência adicional em *K. pneumoniae*. Essas carbapenemases estão distribuídas entre as classes A, B e D de Ambler (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

### 2.5. CARBAPENEMASES

Carbapenemases podem ser definidas como enzimas beta-lactamases que possuem a capacidade de hidrolisar, pelo menos parcialmente, imipenem e/ou meropenem (NORDMANN; POIREL, 2002). Somado a isso, elas são capazes de hidrolisar praticamente todos

os demais antibióticos beta-lactâmicos e a maioria é fracamente inibida por inibidores de beta-lactamases (NORDMANN; POIREL, 2002; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

As carbapenemases formam um grupo bastante heterogêneo, estando distribuídas em quatro diferentes classes moleculares (A, B, C e D), das quais as classes A, B e D são as mais relevantes na clínica. Essas enzimas pertencem a dois grandes grupos moleculares que se distinguem pelo mecanismo de hidrólise: enzimas que possuem o aminoácido serina no seu sítio ativo (classes A, C e D); e as que possuem um íon de zinco no sítio ativo (classe B), também conhecidas como metalo-beta-lactamases (BOYLE; ZEMBOWER, 2015).

### 2.5.1. Carbapenemase do tipo KPC

KPC é uma serina beta-lactamase pertencente à classe A de Ambler e ao grupo 2f segundo Bush produzida por bactérias Gram-negativas. Quando presente, esse tipo de enzima confere resistência a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, e podem ser inibidas por inibidores de beta-lactamase, como ácido clavulânico (fracamente) e tazobactam (fracamente) (MUNOZ-PRICE et al., 2013; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Essa enzima é frequentemente encontrada em elementos genéticos móveis (EGM) denominados plasmídeos. Plasmídeos são elementos de dupla fita de DNA presentes na bactéria, que possuem um aparato de replicação independente do cromossoma bacteriano (CARATTOLI, 2013). Eles podem sofrer transferência horizontal inter- e intra-espécies por meio de conjugação bacteriana. Como os plasmídeos geralmente carregam genes de resistência aos antibióticos, a transferência horizontal tem uma grande importância para o rápido aumento da disseminação dessas formas de resistência (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Além de estar inserido em plasmídeos, o gene que codifica para KPC comumente está em um EGM chamado transposon Tn4401. Os transposons, também conhecidos como *jumping* genes, são sequências de DNA que movem de um local para outro do genoma. O transposon Tn4401 possui um tamanho de 10 quilo bases (kb), contendo genes de transposase (*tmpA*) e resolvase (*tmpR*) da família Tn3 e duas sequências de inserção. A associação de Tn4401 com *bla*<sub>KPC</sub> e outros determinantes de resistência aos antibióticos é uma maneira efetiva para disseminação da carbapenemase do tipo KPC, mesmo na

ausência de seleção com carbapenêmico (NAAS et al., 2008; PECORA et al., 2015).

Até 2015, mais do que 100 tipos de ST (*Sequence Type*) carreando *bla*<sub>KPC</sub> já haviam sido descritos. Apesar disso, a rápida disseminação mundial de Kp-KPC é agora entendida como um fenômeno clonal. Membros do complexo clonal 258 (CC258) estão globalmente distribuídos. CC258 consiste de um ST predominante, chamado ST258 (*Sequence Type* 258), e com menor frequência de ST11, ST340 e ST512, os quais diferem de ST258 por um único *locus* (DOI; PATERSON, 2015; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). *K. pneumoniae* ST258 é um clone de alto risco, e recentes estudos sobre sua epidemiologia, rearranjo genético e evolução forneceram algumas evidências sobre a disseminação da resistência aos antimicrobianos (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). Clones de alto risco são assim definidos por possuírem uma distribuição global, mostrarem uma melhora na capacidade de colonização, disseminação e persistirem em uma variedade de ambientes (BAQUERO; TEDIM; COQUE, 2013). Esses clones possuem tenacidade e flexibilidade para acumular e realizar troca de genes de resistência e virulência com outras bactérias e, com o tempo, foram adquirindo certas características que aumentaram sua patogenicidade e capacidade de sobrevivência (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Além disso, devido à habilidade de alguns isolados de sobreviverem por longos períodos em temperaturas extremas, os clones de alto risco possuem um importante papel na transferência horizontal de determinantes de resistência, agindo como eficientes doadores e receptores (WARNES; HIGHMORE; KEEVIL, 2012).

### 2.5.2. Detecção de carbapenemases – fenotípica e molecular

A detecção da enzima KPC em isolados bacterianos é um desafio na clínica. Isso porque muitas vezes a resistência aos carbapenêmicos é de baixo nível ou pode estar relacionada a outros mecanismos. A suspeita de produção de KPC ocorre em isolados que possuem resistência total ou intermediária aos carbapenêmicos. Em *K. pneumoniae* e *E. coli*, o ertapenem é o marcador mais sensível para detectar a presença de carbapenemases, por possuir maior sensibilidade frente a outros carbapenêmicos. Portanto, aqueles isolados que são resistentes ou possuem resistência intermediária ao ertapenem devem ser submetidos a testes fenotípicos de triagem para detecção da produção de

carbapenemases (ANVISA, 2013; MUNOZ-PRICE et al., 2013; DOI; PATERSON, 2015).

Nesse contexto, existem diversos métodos que podem ser utilizados para a pesquisa da presença de KPC em um isolado clínico, sejam eles moleculares ou fenotípicos. Em laboratórios de microbiologia clínica, a abordagem não molecular é a mais adotada, por não requerer instrumentos e pessoal especializado (DOI; PATERSON, 2015). Um dos métodos mais adotado e aprovado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para detecção de carbapenemases é o MHT (LEE et al., 2001). Esse teste é realizado semeando-se um inóculo correspondente a 0,5 da escala de McFarland da cepa de *E. coli* ATCC 25922 em uma placa de ágar Müeller-Hinton e colocando-se no centro da placa um disco de imipenem ou ertapenem de 10 µg. Em seguida, estria-se a amostra a ser testada do centro da placa, sem tocar o disco, até a borda da placa. Após incubação a  $36 \pm 2$  °C por 16 a 18 h deve-se observar o crescimento da *E. coli* no halo de inibição do carbapenêmico utilizado. Quando o teste é positivo, nota-se uma distorção do halo de inibição do carbapenêmico, indicativa de produção de carbapenemase pela bactéria, não sendo específico para detecção de KPC. O MHT não necessita de nenhum equipamento ou reagente especial, mas a interpretação dos resultados é subjetiva. Além disso, esse teste pode apresentar resultados falso-positivos em isolados bacterianos que produzam altos níveis de beta-lactamase do tipo AmpC, frequente em *Enterobacter* spp. Devido ao isolamento de bactérias produtoras de NDM no Rio Grande do Sul em 2013, a utilização do MHT foi desaconselhada pela ANVISA por apresentar baixa sensibilidade para a detecção dessa nova carbapenemase (ANDERSON et al., 2007; DOYLE et al., 2012; NORDMANN et al., 2012; ANVISA, 2013; MUNOZ-PRICE et al., 2013; DOI; PATERSON, 2015).

Em países ou regiões onde os organismos produtores de KPC são endêmicos, mas que também existam outros tipos de carbapenemases, o teste com a utilização de inibidores de carbapenemases é uma alternativa viável. A inclusão de determinados inibidores auxilia na discriminação entre os tipos de carbapenemases. Esse teste inclui discos de meropenem e imipenem acrescidos de EDTA, para inibição de metalo-beta-lactamases; cloxacilina, para inibir especificamente a atividade da beta-lactamase do tipo AmpC; e ácido fenilborônico (AFB), para inibir KPC. Os isolados testados que apresentarem uma diferença, somente para o AFB, maior ou igual a 5 mm entre os discos de meropenem e imipenem com e sem o aditivo, devem ser considerados como produtores de KPC,

sem necessidade de realizar outros testes confirmatórios (ANVISA, 2013; DOI; PATERSON, 2015).

Recentemente, testes para detecção rápida de carbapenemases foram desenvolvidos. Esses métodos baseiam-se no fato de que a hidrólise do anel beta-lactâmico do carbapenêmico (imipenem) pela carbapenemase leva a uma redução de pH, que pode ser observada pela mudança de cor da solução. Os testes de detecção rápida de carbapenemases possuem uma sensibilidade equivalente e especificidade superior em comparação com o MHT e ainda têm como vantagem não precisarem de um dia a mais de cultura para leitura dos resultados. Apesar disso, não é possível determinar o tipo de carbapenemase produzida (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012; PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013; DOI; PATERSON, 2015).

### **2.5.3. Epidemiologia e histórico de KPC**

A enzima KPC foi identificada pela primeira vez em uma bactéria da espécie *K. pneumoniae*, a qual deu origem ao nome, no Estado da Carolina do Norte, EUA em 1996 (YIGIT et al., 2001). Esse achado foi rapidamente seguido por relatos de isolados positivos para KPC em hospitais da cidade de Nova Iorque entre 1997 e 2001 (BRADFORD et al., 2004). Em um estudo de vigilância, Bratu e colaboradores (2005) identificaram 3,3% de isolados produtores da enzima KPC em sete diferentes hospitais de Nova Iorque entre 2002 e 2003. Esse estudo, associado a outros estudos de vigilância, sugerem essa região como sendo o epicentro dessa epidemia, que se disseminou de forma muito veloz por diversos países de todos os continentes (BRADFORD et al., 2004; BRATU et al., 2005).

O primeiro país além dos EUA que evidenciou um surto de âmbito nacional foi Israel. Um aumento acentuado no número de isolados de KPC foi identificado em hospitais da capital Tel Aviv entre 2005 e 2006, os quais mostraram estar geneticamente relacionados com os isolados circulantes em hospitais norte-americanos (NAVON- VENEZIA et al., 2009; DOI, & PATERSON, 2015). O mais aceito atualmente é que a introdução da bactéria KPC em Israel foi o estopim para sua disseminação, primeiramente na Grécia, e posteriormente para outros países europeus (WERNLI et al., 2011). Mais tarde, bactérias produtoras de KPC estabeleceram-se em hospitais dos Estados vizinhos de Nova Iorque e durante o mesmo período, surgiram na América Latina, seguido de outros países, como a China, aparentemente devido à transferência de pacientes colonizados (VILLEGAS, et al., 2006;

LEAVITT et al., 2007; WEI et al., 2007; PASTERAN, et al., 2008; KITCHEL et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; GIAKOUPI et al., 2009; JAIN et al., 2013).

No Brasil, os primeiros casos foram descritos em 2006 no Recife, onde quatro isolados produtores de KPC foram identificados em amostras de corrente sanguínea e urina de quatro pacientes distintos (MONTEIRO et al., 2009). Desde a primeira descrição, várias publicações têm demonstrado sua disseminação em todo o território brasileiro (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO, et al., 2009; ZAVASCKI, et al., 2009; D'ALINCOURT, et al., 2010). Mais especificamente na Região Sul do Brasil, as primeiras descrições remetem a duas cidades do Estado de Rio Grande do Sul em amostras recuperadas de 2007 e 2008 (ZAVASCKI, et al., 2009).

A epidemiologia exata da expansão da enzima KPC e sua prevalência no cenário mundial variam conforme a localização geográfica (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Após os primeiros relatos, muitos surtos nosocomiais têm sido relatados na América do Norte (principalmente nos EUA), América do Sul (Brasil e Colômbia), Europa (Grécia, Itália, Polônia), Ásia (China) e Oriente Médio (Israel) (DESHPANDE et al., 2006; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; DOI; PATERSON, 2015). Bactérias produtoras de KPC são consideradas endêmicas em algumas partes do mundo, como Nordeste dos EUA, Porto Rico, Colômbia, Brasil, Grécia, Itália, Israel e China, sendo importantes causas de infecções adquiridas em ambiente hospitalar (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Apesar de ter sido inicialmente descrita em uma bactéria da espécie *K. pneumoniae*, KPC tem sido identificada em diversos outros bacilos Gram-negativos, principalmente da família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter freundii* (DESHPANDE et al., 2006; RASHEED et al., 2008), *Enterobacter aerogenes* (BRATU et al., 2005), *Enterobacter cloacae* (BRATU et al., 2005; DESHPANDE et al., 2006), *E. coli* (BRATU et al., 2007) e *Klebsiella oxytoca*. Também pode ser encontrada com menos frequência em bacilos não-fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (VILLEGAS et al., 2007; KITCHEL et al., 2009). Beta-lactamases do tipo KPC têm sido extensivamente relatadas principalmente em *K. pneumoniae* (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

Atualmente, mais de 20 diferentes tipos de KPC foram descritos, sendo KPC-2 (mais tarde demonstrada ser idêntica à KPC-1) e KPC-3 os mais comumente identificados no mundo (WALTHER-



RASMUSSEN; HOIBY, 2007; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). O perfil de atividade enzimática é muito similar entre os tipos de KPC, embora a eficiência catalítica de algumas variantes seja mais elevada para alguns antimicrobianos. É o caso da KPC-3, que possui uma atividade catalítica aproximadamente 30 vezes mais alta com ceftazidima do que KPC-2 (SACHA et al., 2009). Além disso, isolados produtores de KPC podem apresentar uma variedade de CIM (concentração inibitória mínima) para os carbapenêmicos. Por exemplo, sabe-se que a produção de KPC associada à perda de porinas pode resultar em um aumento da CIM. Outros fatores também resultam em um aumento da CIM, como o aumento na expressão do gene *bla*<sub>KPC</sub>, deleções próximas a região promotora do gene e múltiplas cópias do gene no plasmídeo (KITCHEL et al., 2010).

## 2.6. CULTURAS DE VIGILÂNCIA

Pacientes colonizados são o principal reservatório para disseminação nosocomial e consequente surto hospitalar por microrganismos multirresistentes, dentre eles Kp-KPC (TOFTELAND et al., 2013). Uma vez que a maioria dos pacientes colonizados são portadores assintomáticos, a disseminação para outros pacientes muitas vezes ocorre antes da identificação do primeiro caso. Além disso, a colonização pode preceder e possivelmente servir como uma fonte de infecção clínica em aproximadamente 9% dos portadores (BORER et al., 2012; SCHECHNER et al., 2012). Por isso, estratégias de vigilância ativa devem ser estabelecidas como parte de programas nacionais e locais, a fim de controlar a propagação desses microrganismos no ambiente de saúde (FELDMAN et al., 2012; TÄNGDÉN; GISKE, 2015).

No Brasil, a ANVISA recomenda a realização de culturas de vigilância para detectar portadores gastrointestinais de KPC nos hospitais em que houve a descrição de casos dessas carbapenemases. As amostras a serem utilizadas para avaliação da colonização são o material coletado com *swab* retal ou fezes (ANVISA, 2013).

## 2.7. PULSED-FIELD GEL ELETROPHORESIS (PFGE)

Eletroforese em campo pulsado (do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* ou PFGE) é uma técnica para separação de grandes fragmentos de DNA por meio de campos elétricos alternados. PFGE é reconhecido como o padrão áureo para identificação de clones

bacterianos (MAGALHÃES et al., 2005). De um ponto de vista epidemiológico, PFGE é frequentemente empregado para determinar a clonalidade dos isolados bacterianos, sendo particularmente importante em surtos nosocomiais (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Um clone bacteriano refere-se a isolados estreitamente relacionados que recentemente divergiram de um ancestral comum (DIJKSHOORN; URSING; URSING, 2000). Entretanto, os genomas bacterianos são muito susceptíveis a rearranjos (por exemplo, inserções e deleções). Assim, os isolados bacterianos atribuídos ao mesmo clone podem não ser idênticos, bem como isolados descendentes do mesmo ancestral podem diferir ligeiramente em seus genótipos (SPRATT, 2004). Portanto, a definição de clone tende a não ser tão rigorosa, sendo os clones definidos como isolados que são indistinguíveis ou altamente similares um aos outros. A identificação de clones depende muito da técnica molecular utilizada na tipagem. O PFGE é uma técnica com um dos mais altos níveis de poder discriminatório para tipagem bacteriana. Em 1995, Tenover e colaboradores padronizaram e estabeleceram critérios de interpretação para definição de clones na técnica de PFGE, dependendo do padrão de diferença de bandas entre um isolado e outro (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). Com o passar do tempo, o PFGE tem sido substituído pela técnica MLST (do inglês *Multilocus Sequence Typing*) para determinação de clones bacterianos, como os clones de alto risco distribuídos mundialmente. Apesar disso, o MLST tem um menor poder discriminatório do que o PFGE. Clones identificados por MLST frequentemente possuem diferentes pulsotipos na técnica PFGE. Um estudo mostrou que uma coleção internacional de estirpes de *K. pneumoniae* ST258 (identificadas por MLST) consistiu em quatro diferentes pulsotipos que mostraram uma distribuição geográfica distinta (LASCOLS et al., 2013; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

## 2.8. TRATAMENTO

A disseminação mundial de bactérias produtoras de carbapenemase é uma ameaça para o tratamento com os antimicrobianos disponíveis atualmente (RODLOFF; GOLDSTEIN; TORRES, 2006; SACHA et al., 2009). Infecções por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase apresentam um índice de mortalidade que pode chegar até 75%, o qual é atribuído principalmente à falta de antimicrobianos para o tratamento e as comorbidades do paciente. Somando-se a isso, uma terapia antimicrobiana empírica inapropriada em infecções graves

está associada com um aumento na morbidade e mortalidade (KARAIKOS; GIAMARELLOU, 2014; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Bactérias produtoras de carbapenemase do tipo KPC são multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug-resistant*). Essas bactérias carregam plasmídeos e transposons com genes de resistência não só a toda classe dos beta-lactâmicos, mas também a outras classes de antibióticos, incluindo fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, reduzindo ainda mais as opções de tratamento (CASTANHEIRA et al., 2008; ENDIMIANI et al., 2009; LEE; BURGESS, 2012).

Até o momento, nenhum protocolo para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase foi estabelecido e nenhum antibiótico atualmente disponível, utilizado em terapia simples, parece ser efetivo no tratamento de infecções com todos os tipos de carbapenemases. A maioria dos dados clínicos da eficácia dos antibióticos no tratamento de produtores de carbapenemase é de relatos de casos e séries de casos, principalmente por Kp-KPC (FALAGAS et al., 2014). Muitas vezes, somente polimixinas (colistina e polimixina B), tigeciclina, fosfomicina e alguns aminoglicosídeos possuem atividade *in vitro* (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2015). Por geralmente carregarem outros genes de resistência, esses microrganismos possuem um perfil de resistência muito diversificado, tornando a terapia antimicrobiana empírica um grande desafio. Por isso, destaca-se a importância na realização de testes de sensibilidade aos antibióticos de última escolha, como polimixinas, fosfomicina, tigeciclina e rifampicina, para definição da terapia a ser adotada (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2015; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Uma importante questão que ainda permanece sem uma resposta definitiva é qual a melhor terapia antimicrobiana a ser adotada para o tratamento dessas infecções: monoterapia ou terapia combinada. A terapia antimicrobiana combinada pode maximizar a morte bacteriana por sinergismo e minimizar a seleção de resistência, sendo que a melhor associação contém pelo menos dois antimicrobianos com atividade *in vitro* (FALAGAS et al., 2014, TZOUVELEKIS et al., 2014). Diversos estudos relatam uma mortalidade significativamente menor em pacientes, quando administrada a terapia combinada (ZAVASCKI; BULITTA; LANDERSDORFER, 2013; DAIKOS et al., 2014; TZOUVELEKIS et al., 2014), embora outros estudos não encontraram superioridade da terapia combinada, quando comparada com a monoterapia (FALAGAS et al., 2014; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Os carbapenêmicos, apesar de serem hidrolisados pela carbapenemase, podem manter alguma atividade contra KPC. Estudos indicam uma

redução da mortalidade quando utilizado em terapia combinada e quando a CIM está abaixo de 8 µg/mL (DAIKOS et al., 2014; KARAIKOS; GIAMARELLOU, 2014).

### 3. JUSTIFICATIVA

Infecções por bactérias produtoras de KPC são altamente associadas à falha terapêutica e taxas de mortalidade em torno de 50%. Devido ao seu elevado potencial de disseminação, essas infecções têm se tornado endêmicas nas diversas instituições de saúde, revelando-se um grande problema de saúde pública. A falta de antimicrobianos eficazes para o tratamento dessas infecções está prejudicando a capacidade de combater as doenças infecciosas mais comuns, e também o tratamento de complicações infecciosas em pacientes internados em ambientes hospitalares.

A resistência bacteriana, em especial CREs, ameaça os avanços obtidos pela medicina moderna. Para pacientes em quimioterapia ou submetidos a cirurgias complexas, por exemplo, a infecção torna-se rapidamente um problema sério e antimicrobianos efetivos são críticos para evitar complicações graves e a morte. Infecções causadas por CRE, em ascensão entre os pacientes internados em nossas instituições, requerem tratamentos prolongados e mais onerosos, utilizando-se normalmente combinações de fármacos na tentativa de erradicar o patógeno. A resistência bacteriana aumenta também o tempo de internação e a mortalidade entre os pacientes, o que resulta em um acréscimo significativo no custo direto para o sistema de saúde, bem como, um custo adicional para a sociedade devido à perda de produtividade.

Entre as estratégias sugeridas para enfrentar o problema da resistência bacteriana, o monitoramento dos microrganismos resistentes é uma ferramenta fundamental. Neste processo, busca-se compilar e avaliar dados sobre as causas de infecções por Kp-KPC, sobre os fatores de risco que levam alguns pacientes a terem infecções por este microrganismo e a eficiência do tratamento utilizado. A terapia apropriada de infecções graves causadas por esses microrganismos é um grande desafio. Como muitos dos antibióticos normalmente utilizados são inativos contra esse tipo de infecção, opta-se pela utilização de antibióticos de amplo espectro, que contribuem para seleção de uma maior resistência e expõem os pacientes a toxicidade. Nesses casos, estudos do tipo caso-controle são importantes para identificar os fatores de risco dessas infecções e assim auxiliar na seleção de pacientes que devem receber um tratamento empírico abrangendo CREs.

A caracterização tanto genotípica quanto fenotípica do microrganismo, bem como do mecanismo de resistência completam o monitoramento. A identificação de fatores associados com infecção por

microrganismo multirresistente auxilia na compreensão dos determinantes de disseminação dentro da instituição e guia a escolha empírica de antimicrobianos para tratamento de infecções sérias, fator crítico para a sobrevivência do paciente. O conjunto de informações provenientes do monitoramento de Kp-KPC deve servir de base para o desenvolvimento de estratégias específicas pelo sistema de saúde para prevenir essas infecções e frear a disseminação de CRE.

## 4. OBJETIVO

Avaliar os aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções nosocomiais por Kp-KPC em estudo caso-controle.

### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Parear pacientes com infecções por Kp-KPC (casos) com pacientes com infecções por Kp-não-KPC (controles), por idade, gênero, período de diagnóstico de infecção e sítio de infecção;

2- Correlacionar os aspectos clínicos e comorbidades como a presença de disfunção hepática/cirrose, contagem de neutrófilos inferior a  $1.500/\text{mm}^3$ , infecção pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), valor de hemoglobina menor que 10 g/dl, diabetes, insuficiência renal, doença cardiopulmonar e realização de transplante;

3- Correlacionar os fatores de risco, como tempo de hospitalização, admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), cirurgia durante a hospitalização, utilização de cateter venoso (central e periférico) e urinário, ventilação mecânica, utilização prévia de diferentes tipos de antimicrobianos, internação prévia e transferência de outros hospitais;

4- Avaliar a efetividade do tratamento utilizado para cada caso e o desfecho da infecção;

5- Avaliar fenotipicamente os isolados de *K. pneumoniae* recuperados de amostras clínicas no laboratório de microbiologia da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC;

6- Caracterizar, por métodos moleculares, as carbapenemases produzidas pelos isolados de *K. pneumoniae*;

7- Correlacionar o desfecho clínico (cura ou óbito) com as variáveis epidemiológicas;

8- Avaliar a variabilidade genética dos isolados de *K. pneumoniae* da instituição.





## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. LOCAL E ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo foi conduzido no HU/UFSC, localizado na cidade de Florianópolis/Santa Catarina. Obteve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) em 05 de Dezembro de 2013, sob parecer número 465.584 e no CEP da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em 15 de Dezembro de 2015, sob parecer número 1.368.696.

### **5.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Por tratar-se de um estudo retrospectivo, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) para participação na pesquisa foi coletado mediante contato telefônico diretamente com o paciente ou responsável pelo mesmo.

### **5.3. TIPOS DE ESTUDO E AMOSTRAGEM**

O estudo global abrange dois estudos complementares: estudo caso-controle e estudo de clonalidade dos isolados de Kp-KPC.

### **5.4. CULTURAS**

As culturas foram processadas conforme a rotina do setor de Microbiologia, baseada no manual de procedimentos da Sociedade Americana de Microbiologia (GARCIA; ISEMBERG, 2010). A identificação bacteriana e o teste de susceptibilidade foram realizados pelo sistema automatizado Vitek® 2 (BioMérieux, France). As CIMs para meropenem foram determinadas com base no CLSI (CLSI, M100-S20-U).

#### **5.4.1. Culturas de Vigilância**

As culturas de vigilância foram processadas conforme recomendação da Nota Técnica nº01/2013 da ANVISA. O *swab* utilizado para a coleta das amostras de vigilância foi inoculado em meio líquido (caldo BHI [*Brain Heart Infusion Broth*]) com um disco de ertapenem (10 µg). As culturas foram incubadas por 12 a 18 horas a

36±1°C antes do repique para o meio sólido. A seguir, a amostra foi subcultivada em ágar MacConkey por esgotamento e foi aplicado sobre a superfície do meio já semeado dois discos de ertapenem. Incubou-se por 18 a 24 horas a 36±1°C em ar ambiente. As colônias com morfologia distintas que cresceram dentro de um halo com diâmetro igual ou menor que 27 mm ao redor do disco de ertapenem, foram triadas por teste fenotípico para a presença de carbapenemases (ANVISA, 2013).

## 5.5. TRIAGEM E TESTES FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES

Todos os isolados de *K. pneumoniae* resistentes ao ertapenem foram submetidos a testes fenotípicos para determinação de carbapenemases.

### 5.5.1. Teste de Hodge Modificado (MHT)

O MHT foi realizado para a pesquisa de carbapenemases nas amostras de Janeiro de 2012 a Julho de 2013, as quais são anteriores à utilização do teste fenotípico com inibidores e potenciador enzimáticos. Esse teste foi realizado semeando-se um inóculo correspondente a 0,5 da escala de McFarland da cepa de *E. coli* ATCC 25922 em uma placa de ágar Müeller-Hinton e colocando-se no centro da placa um disco de imipenem ou ertapenem de 10 µg. Em seguida, estriou-se o isolado a ser testado do centro até a borda da placa, sem tocar o disco. Após incubação a 35±2°C por 16 à 18h, observou-se o crescimento da *E. coli* no halo de inibição do carbapenêmico. Os isolados que apresentaram uma distorção do halo de inibição do carbapenêmico foram testados por metodologia molecular para confirmação de carbapenemase do tipo KPC.

### 5.5.2. Teste com Inibidores e Potenciador Enzimáticos

Os testes foram realizados segundo padronização da Nota Técnica N° 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com bloqueadores e potenciador enzimáticos (ANVISA, 2013). Utiliza discos de meropenem e imipenem acrescidos de: ácido fenilborônico, inibidor da enzima KPC; EDTA, inibidor de metalo-beta-lactamase; e cloxacilina, inibidor de AmpC plasmidial que atua potencializando a ação do carbapenêmico. O diâmetro do halo de

inibição destes discos é comparado com o diâmetro de discos de imipenem e meropenem sem adição de inibidores ou potenciador. Diferenças de diâmetro  $\geq 5$  mm para o carbapenêmico com EDTA devem ser considerados potenciais produtores de metalo-beta-lactamase. Diferenças de diâmetro  $\geq 5$  mm para o carbapenêmico com ácido fenilborônico devem ser considerados produtores de KPC. Diferenças de diâmetro  $\geq 5$  mm para o carbapenêmico com ácido fenilborônico e com cloxacilina devem ser considerados produtores de AmpC plasmidial e deficientes em porinas. Neste último caso, deve-se confirmar por técnicas de biologia molecular a presença de KPC, que pode estar presente juntamente com AmpC. Os microrganismos com testes fenotípicos positivos foram confirmados por PCR, inoculados em caldo BHI com 20% de glicerol e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

#### 5.6. TESTE MOLECULAR CONFIRMATÓRIO PARA CARBAPENEMASES

Todas as amostras com testes fenotípicos positivos foram confirmadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A extração do DNA foi realizada por lise térmica à  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos a partir de uma suspensão bacteriana em 1 mL de Tampão PBS 1X. Após isso, a suspensão foi centrifugada a  $20817 \times g$  por 1 minuto e retirou-se 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para ser utilizado na PCR. A PCR foi padronizada utilizando-se iniciadores específicos KpcA1 CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC e KpcB2 CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC, que amplificam um fragmento de 795pb. A reação foi feita em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 3,75 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante e 2  $\mu\text{L}$  do sobrenadante contendo DNA. As condições de amplificação foram:  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos,  $62^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 50 segundos, com extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Applied® (Applied 2720) (NAAS et al., 2008). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizadas sob luz Ultra Violeta (UV) após imersão do gel em Brometo de Etídio (1  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 5.7. ESTUDO CASO-CONTROLE

Esse é um estudo observacional transversal e retrospectivo, com proporção caso:controle de 1:1. O estudo incluiu oitenta (80) amostras bacterianas de *K. pneumoniae* isoladas de amostras clínicas encaminhadas para o Setor de Microbiologia da Divisão de Análises Clínicas/Hospital Universitário da UFSC. São amostras de urina ou hemocultura provenientes de oitenta (80) pacientes que estiveram internados no HU/UFSC entre Abril de 2012 e Novembro de 2014. Para o grupo Caso, foram selecionados quarenta (40) isolados de Kp-KPC. Nas situações em que foram isoladas duas amostras de sítios anatômicos diferentes do mesmo paciente optou-se pela amostra mais representativa de infecção (hemocultura). Já para o grupo controle, foram selecionados quarenta (40) isolados de Kp-não-KPC. Quando um paciente teve múltiplos episódios de infecção, apenas a primeira amostra foi incluída no estudo. Os isolados caso-controle foram pareados por tipo de amostra clínica (urina ou hemocultura), gênero, idade (admitindo-se diferença máxima de dez anos) e data do resultado da cultura (diferença máxima de cinco meses).

### 5.7.1. Calculo Amostral

Tomando-se como base um nível de confiança bilateral de 95%, um poder de detecção de 80%, uma razão de controles por caso de 1, uma proporção hipotética de controles com exposição de 50%, uma proporção hipotética de casos com exposição de 80%, e Razões de Chance (RC) menos extremas a serem detectadas de 4, a amostra foi calculada em 40 casos e 40 controles, com um tamanho total de 80 amostras.

### 5.7.2. Análise dos Prontuários Médicos

A busca de dados para o estudo caso-controle foi realizada por análise dos prontuários de cada paciente. Os prontuários ficam arquivados no Serviço de Prontuário do Paciente, setor de Arquivo e Estatística do HU/UFSC e foram disponibilizados para análise mediante assinatura do professor responsável pela pesquisa. Cada solicitação pode conter no máximo trinta (30) prontuários e uma nova busca só pode ser solicitada após a devolução do último prontuário retirado. A coleta dos dados ocorreu entre Fevereiro de 2014 e Dezembro 2015, iniciando-se pelos pacientes do grupo caso. Para isso, fez-se o pedido dos prontuários

de todos os pacientes que apresentaram algum episódio de infecção por KPC entre Janeiro de 2012 e Dezembro de 2014. Para o grupo controle, realizou-se primeiramente uma busca, no sistema de administração hospitalar da Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC, de pacientes com infecção por Kp-não-KPC que atendessem aos critérios de pareamento das amostras. Em seguida, fez-se o pedido dos prontuários desses pacientes.

### **5.7.3. Critérios de Exclusão**

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão:

- Pacientes que não ficaram internados no HU/UFSC (coleta ambulatorial) e que não geraram prontuário médico;
- Pacientes do grupo caso para os quais não foi possível identificar um paciente para o grupo controle que atendessem os critérios de pareamento das amostras;
- Prontuários que não possuíam alguma das informações de internação do paciente referente à amostra coletada;
- Prontuários não localizados no Setor de Arquivo e Estatística;
- Prontuários que não estavam disponíveis para consulta.

### **5.7.4. Dados dos pacientes**

Nos prontuários foram coletadas as seguintes informações:

- 1- Dados do paciente: idade e sexo;
- 2- Origem do paciente na interação: se o paciente foi ou não internado previamente em alguma instituição até 90 dias antes da presente internação; ou se foi transferido de uma outra instituição hospitalar;
- 3- Fatores de risco de infecções hospitalares na presente internação antes da coleta da amostra: tempo de hospitalização (em dias), admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), cirurgia, presença de cateter venoso e/ou urinário, uso de ventilação mecânica, tratamento com medicamentos anti-inflamatórios esteróides e a utilização de antibióticos de 48 horas até trinta (30) dias antes da coleta.
- 4- Comorbidades: disfunção hepática/cirrose, contagem de neutrófilos inferior a  $1.500/\text{mm}^3$ , infecção pelo HIV, valor de hemoglobina menor que 10 g/dl, diabetes, insuficiência renal relatada (ou valor de creatinina maior que 2,0 mg/dl ou paciente em diálise), doenças cardiopulmonares e transplante;

- 5- Dados de coleta de amostra: unidade de internação, sítio anatômico e terapia antimicrobiana empírica;
- 6- Terapia antimicrobiana após o resultado da cultura;
- 7- Desfecho clínico: óbito ou alta hospitalar.

### **5.7.5. Análise Estatística dos resultados**

Os dados foram organizados em um banco de dados em planilha Excel® e posteriormente exportados para análise estatística no software SPSS 21.0®. Os dados numéricos foram sumarizados como média ou mediana e desvio padrão, valor mínimo e máximo. Os dados nominais foram sumarizados como números absolutos e percentuais. Foram avaliadas as associações entre as variáveis independentes e o desfecho (cura ou óbito), comparando-se o grupo de casos e controles. Foram avaliadas as associações entre as variáveis independentes e a presença ou não de Kp-KPC. As variáveis categóricas foram comparadas usando Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. O Teste Mann-Whitney *U* foi realizado para as variáveis contínuas que não possuíam uma distribuição normal. Foi estimada a RC dos fatores de risco analisados, tomando-se como desfecho a cura ou o óbito, e a presença ou não de Kp-KPC. Os testes foram realizados em um nível de significância estatística de 5%, com intervalo de confiança de 95%.

### **5.8. ESTUDO DE CLONALIDADE DOS ISOLADOS**

A variabilidade genética dos isolados bacterianos foi determinada pelo perfil de macrorestrição do cromossomo utilizando-se a técnica PFGE. Esse é um estudo retrospectivo com bactérias Kp-KPC de um banco de amostras. Para esta metodologia, foi analisado um (1) isolado de Kp-KPC de cada paciente entre Janeiro de 2012 e Dezembro de 2014. Dos pacientes que possuíam mais de um isolado positivo para KPC em sítios anatômicos diferentes, foi selecionada a amostra mais representativa de infecção. Aqueles em que foram isoladas duas amostras positivas para KPC no mesmo sítio anatômico em momentos diferentes, optou-se pela primeira amostra. Foram analisadas tanto as amostras clínicas (hemocultura, urina, secreção traqueal, cateter, escarro e tecido), quanto as amostras de cultura de vigilância (*swab* retal e secreção traqueal).

### 5.8.1. Preparação dos Blocos com DNA

Os isolados foram semeados em Ágar Sangue (*Columbia agar* + 5% *sheep blood*/BioMérieux®) e incubados a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 à 24 horas. Utilizando uma colônia isolada, foi preparada uma suspensão bacteriana em 10 mL de caldo BHI (Sigma-Aldrich®), sendo realizada uma nova incubação a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 à 24 horas. Após esse período, os tubos de BHI contendo o crescimento bacteriano foram centrifugados a  $1.110 \times g$  por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi suspenso em 1 mL de solução Salina/EDTA pH 7,5 (70 mM de NaCl, 30 mM de EDTA), toda a suspensão foi transferida para um microtubo tipo *ependorf* de 1,5 mL (previamente pesado) e centrifugado a  $1.235 \times g$  por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, o microtubo foi novamente pesado e um volume de solução Salina/EDTA foi adicionado de acordo com o peso do sedimento de cada amostra, para que a concentração final fosse de 1 mg/ $\mu\text{L}$ . Essa mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex e 10  $\mu\text{L}$  foram transferidos para outro microtubo, contendo 500  $\mu\text{L}$  de solução Salina/EDTA, previamente mantido em Banho Maria (BM) a  $56^{\circ}\text{C}$ . A essa nova mistura, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure™ Low Melting Point Agarose/Invitrogen™*) a 2% (m/v), também previamente mantida em BM a  $56^{\circ}\text{C}$ . Após homogeneizar, a mistura foi aplicada em um molde de acrílico (10mm x 6mm x 1mm) e acondicionada em refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para formar blocos de agarose contendo a suspensão bacteriana. Em seguida, os blocos foram removidos dos moldes, adicionados em tubos contendo 3 mL de Tampão de Lise pH 9,5 (10% [v/v] de NaOH 10 M, 1% [m/v] de *N*-lauril sarcosina [Sigma-Aldrich®], 0,64 M de EDTA) acrescido de 50 mg/mL de Proteinase K (Ambion/ThermoFisher Scientific®) e incubados *overnight* em BM a  $56^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o tampão de lise foi descartado e foram realizadas quatro (4) lavagens com Tampão Tris-EDTA (TE) 1X pH 7,5 (10 mM de Tris Base, 13 mM de EDTA) com incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos entre cada lavagem. Até a utilização, os blocos foram armazenados em TE 1X a  $4^{\circ}\text{C}$ , por até seis meses.

### 5.8.2. Clivagem do DNA com Enzima de Restrição

Uma parte do bloco de agarose de aproximadamente quatro milímetros foi selecionada e colocada em um microtubo de 1,5 mL para clivagem do DNA bacteriano. Utilizou-se 10 U da enzima *Xba*I

(ThermoFisher Scientific®), que reconhece e cliva o DNA cromossômico no sítio de restrição T<sup>A</sup>CTAGA, em 50 µL de Tampão Thermo Scientific Tango 1X (disponível no kit) com uma incubação a 37°C por 16 horas.

### **5.8.3. Eletroforese em Gel de Agarose**

Foi preparado um gel a 1,2% de agarose (grau molecular) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), utilizando o molde para 15 amostras. Após a polimerização da agarose, por pelo menos 30 minutos, o gel foi carregado com os blocos, tomando o cuidado de encostá-los na parede anterior dos poços e evitando a formação de bolhas. Foi adicionado um marcador de tamanho molecular no primeiro e último poços. Os poços foram selados com agarose de baixo ponto de fusão. A cuba de eletroforese foi carregada com 3 litros de TBE 0,5X e o módulo de resfriamento foi programado para 12°C. Após o tampão atingir a temperatura programada o gel foi colocado na cuba utilizando o molde e os fixadores. As amostras foram submetidas à eletroforese utilizando-se o equipamento CHEF-DR® III (Bio-Rad®) e adotando-se as seguintes condições de corrida: pulso inicial 5s; pulso final 35s; voltagem: 6 V/cm; tempo: 24 horas; ângulo: 120°; temperatura 12°C. Para que os fragmentos de DNA fossem corados, o gel foi colocado sob imersão em solução de Brometo de Etídio (1 µg/mL) por 35 minutos e depois submetido à luz UV para visualização dos fragmentos de DNA fracionados.



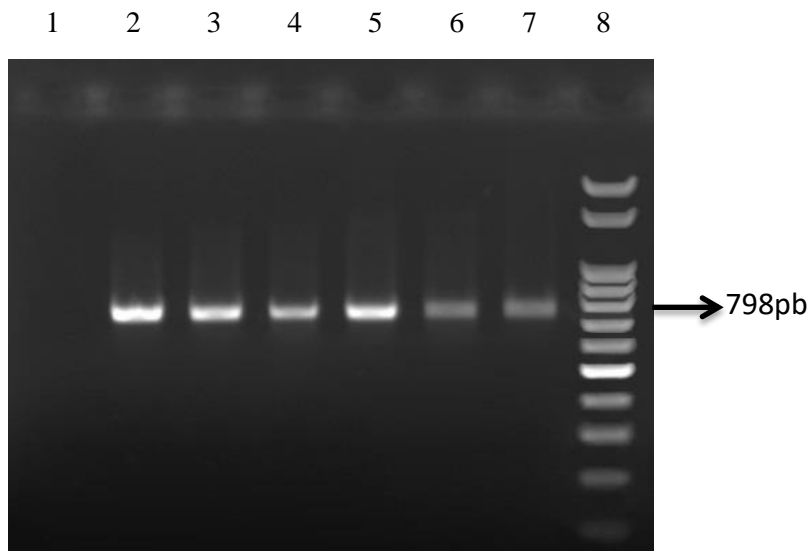
## 6. RESULTADOS

Do grupo caso, foram solicitados 78 prontuários, e pelos motivos já elencados, foram disponibilizados no período 50 prontuários, desses 40 corresponderam aos critérios de inclusão do estudo e foram analisados em detalhe. Dos controles, foram solicitados 52 prontuários. Desses, 12 não atenderam os critérios de inclusão.

Um total de 242 isolados de Kp-KPC foi identificado em 181 pacientes durante o período do estudo (Janeiro de 2012 a Dezembro de 2014). A identificação de todos os isolados foi realizada por meio de triagem fenotípica com MHT, para as amostras até Julho de 2013, e com bloqueadores e potenciador enzimáticos segundo padronização da Nota Técnica nº01/2013 da ANVISA. Todas as amostras positivas nos testes fenotípicos foram confirmadas por PCR. Na Figura 1, podem ser observados os produtos de PCR (795pb) de algumas amostras de Kp-KPC confirmadas pela PCR.

Do total de isolados, 62 foram identificados em 2012, sendo 28 culturas de vigilância e 34 amostras clínicas; 73 em 2013, sendo 33 culturas de vigilância e 40 amostras clínicas; e 107 em 2014, sendo 56 culturas de vigilância e 51 amostras clínicas. Nas situações em que foram isoladas duas ou mais amostras do mesmo paciente optou-se estudar a amostra mais representativa de infecção. Dessa forma, em 2012, 46 pacientes foram infectados/colonizados por Kp-KPC (26 amostras de culturas de vigilância e 20 amostras clínicas); em 2013, 53 pacientes (26 culturas de vigilância e 27 amostras clínicas); e em 2014, 82 pacientes (51 culturas de vigilância e 31 amostras clínicas) (Figura 2). Os isolados foram coletados de diversos sítios: *swab* retal (113), urina (67), hemocultura (25), secreção traqueal (19), amostras de tecido (9), líquido abdominal (3), ponta de cateter (3), dreno (1), escarro (1) e *swab* nasal (1) (Figura 3A).

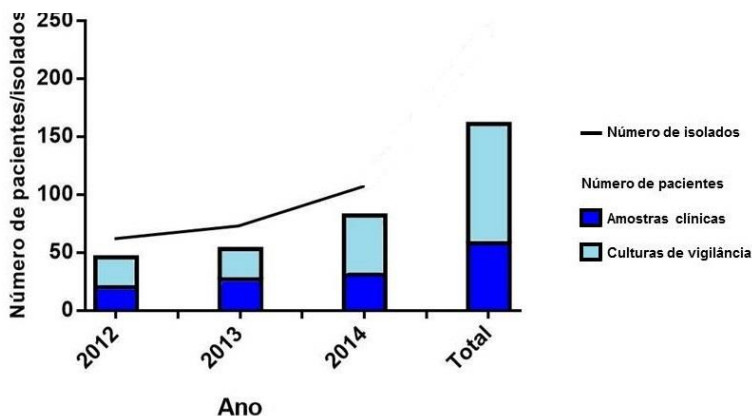
**Figura 1. PCR para detecção de KPC utilizando-se iniciadores específicos para o gene  $bla_{KPC}$ .**



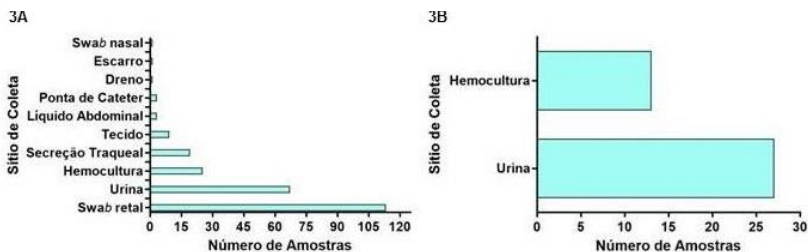
**Canaleta 1:** Controle Negativo; **Canaleta 2:** Controle Positivo (*Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase do tipo KPC); **Canaletas 3-7:** Amostras positivas para KPC; **Canaleta 8:** Padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec®).

Para o estudo caso-controle, as amostras foram pareadas por idade, gênero, sítio anatômico e data do resultado da cultura, como demonstrado na Tabela 2. A diferença máxima de idade entre os grupos foi de oito anos. A diferença máxima da data do resultado da cultura foi de cinco meses.

**Figura 3. Número de isolados e de pacientes identificados com Kp-KPC no HU/UFSC entre 2012 e 2014.**



**Figura 2. 3A - Total de amostras identificadas como Kp-KPC por sítio de coleta no período de estudo no HU/UFSC. 3B - Total de amostras Kp-KPC incluídas no estudo caso-controle.**



**Tabela 2. Características dos pacientes, sítio anatômico e data do resultado do isolamento das bactérias caso e controle.**

GRUPO CASO				GRUPO CONTROLE			
Idade	Gênero <sup>a</sup>	Sítio Anatômico	Cultura <sup>b</sup>	Idade	Gênero <sup>a</sup>	Sítio Anatômico	Cultura <sup>b</sup>
60	M	Hemocultura	06/2012	60	M	Hemocultura	05/2012
52	M	Hemocultura	06/2012	44	M	Hemocultura	06/2012
26	M	Urina	06/2012	32	M	Urina	08/2012
82	F	Urina	06/2012	86	F	Urina	05/2012
75	M	Urina	06/2012	78	M	Urina	06/2012
63	M	Urina	07/2012	64	M	Urina	04/2012
60	F	Urina	09/2012	59	F	Urina	09/2012
58	M	Hemocultura	09/2012	61	M	Hemocultura	10/2012
63	F	Hemocultura	10/2012	64	F	Hemocultura	12/2012
73	M	Urina	11/2012	69	M	Urina	09/2012
89	M	Urina	11/2012	83	M	Urina	10/2012
71	M	Hemocultura	01/2013	77	M	Hemocultura	02/2013
61	F	Hemocultura	01/2013	55	F	Hemocultura	01/2013
63	M	Urina	06/2013	60	M	Urina	04/2013
49	M	Hemocultura	07/2013	49	M	Hemocultura	09/2013
68	F	Urina	07/2013	68	F	Urina	07/2013
52	F	Hemocultura	07/2013	58	F	Hemocultura	08/2013
30	M	Urina	08/2013	35	M	Urina	06/2013
25	M	Urina	09/2013	29	M	Urina	08/2013
75	M	Urina	09/2013	72	M	Urina	10/2013
30	M	Hemocultura	09/2013	35	M	Hemocultura	02/2014
47	F	Urina	10/2013	55	F	Urina	11/2013
55	M	Hemocultura	11/2013	62	M	Hemocultura	12/2013
34	M	Urina	11/2013	39	M	Urina	12/2013
81	M	Urina	02/2014	82	M	Urina	04/2014
70	M	Urina	03/2014	71	M	Urina	06/2014
58	M	Urina	04/2014	51	M	Urina	04/2014
37	F	Urina	04/2014	32	F	Urina	04/2014
75	F	Urina	04/2014	79	F	Urina	04/2014

**Continuação Tabela 2**

78	F	Urina	05/2014	72	F	Urina	05/2014
63	M	Urina	06/2014	67	M	Urina	04/2014
50	M	Urina	06/2014	46	M	Urina	05/2014
50	M	Hemocultura	07/2014	45	M	Hemocultura	05/2014
58	M	Urina	08/2014	57	M	Urina	09/2014
64	M	Urina	09/2014	61	M	Urina	08/2014
48	F	Hemocultura	10/2014	45	F	Hemocultura	09/2014
33	M	Urina	10/2014	33	M	Urina	11/2014
90	M	Urina	10/2014	89	M	Urina	10/2014
53	M	Urina	10/2014	50	M	Urina	10/2014
50	M	Hemocultura	11/2014	47	M	Hemocultura	11/2014

<sup>a</sup>M, Masculino; F, Feminino.

<sup>b</sup>Data do resultado da cultura, expresso em mês/ano.

O estudo incluiu um total de 80 pacientes, sendo 58 (72,5%) do gênero masculino e 22 (27,5%) do gênero feminino. A média de idade de todos os pacientes foi de  $58,0 \pm 16,5$  anos, com idade mínima de 25 anos e máxima de 90 anos. Para o grupo caso, essa média foi de  $57,9 \pm 16,8$  anos (25-90 anos) e para o grupo controle foi de  $58,0 \pm 16,3$  (29-89 anos). A amostragem foi constituída de um total 26 (32,5%) hemoculturas (13 para cada grupo) e 54 (67,5%) amostras de urina (27 para cada grupo) (Figura 3B).

Quanto à origem do paciente no momento da internação no HU/UFSC, 15 (37,5%) do grupo caso vieram transferidos de outras instituições de saúde, enquanto do grupo controle cinco foram transferidos. Dos 25 pacientes do grupo caso que vieram para o HU/UFSC de casa, 17 (68,0%) tiveram uma internação prévia em algum hospital. Desses 17, quatro (23,5%) foram diagnosticados com Kp-KPC nas primeiras 72 horas de hospitalização no HU/UFSC. Dos 15 pacientes do grupo caso que vieram transferidos para o HU/UFSC, cinco (33,3%) foram diagnosticados com Kp-KPC antes de 72 horas de hospitalização. No grupo controle, dos 35 (87,5%) pacientes que vieram de casa, 20 (57,1%) tiveram uma internação prévia. Observa-se que houve diferença significativa entre os grupos caso e controle em relação à origem no momento da admissão, tendo como referência se o paciente foi ou não transferido de outra instituição para o HU/UFSC ( $P=0,010$ ),

mas não houve diferença significativa quando foi avaliada a internação prévia entre os dois grupos ( $P=0,394$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3. Associação entre os grupos em relação à origem do paciente no momento da admissão no HU/UFSC.**

Origem	Grupos		P <sup>c</sup>
	Caso n (%)	Controle n (%)	
<b>Casa</b>	25 (62,5)	35 (87,5)	-
<b>Transferência<sup>a</sup></b>	15 (37,5)	5 (12,5)	0,010
<b>Internação prévia<sup>b</sup></b>	17 (68,0)	20 (57,1)	0,394

<sup>a</sup>Pacientes transferidos de outro hospital.

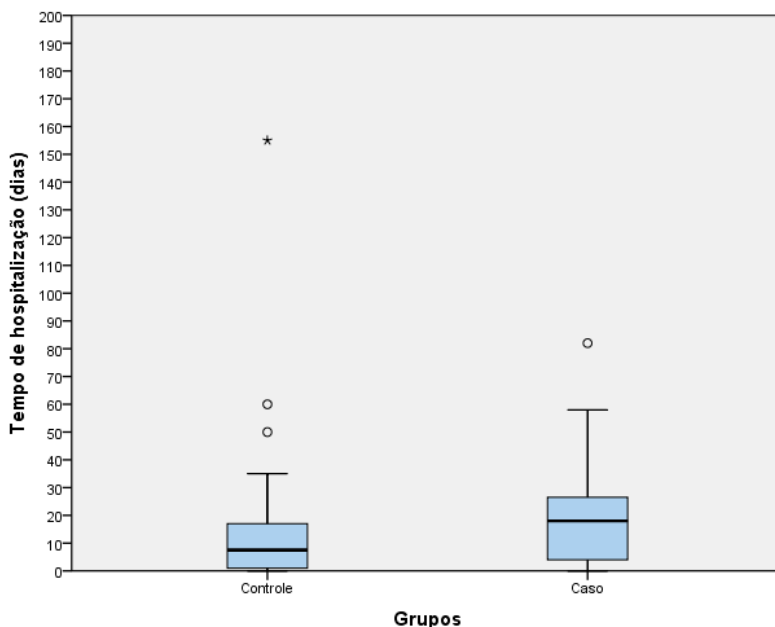
<sup>b</sup>Pacientes oriundos de casa e com internação hospitalar prévia, até 90 dias antes da admissão no HU.

<sup>c</sup>Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fisher.

Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

Observou-se uma diferença no tempo de hospitalização antes da positividade da amostra entre os grupos caso e controle. No grupo caso, esse tempo variou de zero (coleta no mesmo dia de admissão) até 82 dias e a mediana da positividade da amostra desde a admissão do paciente no HU/UFSC foi de 18 dias. Para os pacientes do grupo controle, o tempo variou de zero até 155 dias de internação e a mediana foi de 7,5 dias. Apesar disso, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao tempo de hospitalização ( $P=0,073$ ) (Figura 4).

**Figura 4. Variação do tempo de hospitalização entre os grupos caso e controle.**



Variação interquartil: grupo controle 16 dias; grupo caso 23 dias.

Valores destacados na figura: grupo controle, 52, 61 e 155 dias; grupo caso, 81 dias.

Na Tabela 4 estão descritos os fatores de risco para aquisição de infecção hospitalar aos quais os pacientes foram expostos antes da positividade da amostra. De uma maneira geral, o grupo caso foi exposto com maior frequência aos fatores de risco de infecção analisados. Observa-se que houve diferença significativa entre os grupos em relação aos fatores de risco: admissão na UTI ( $P=0,014$ ), cirurgia durante hospitalização ( $P=0,012$ ), uso de cateter venoso ( $P=0,023$ ) e uso de cateter urinário ( $P=0,015$ ). Todos os pacientes com hemocultura positiva utilizaram cateter venoso e desses, dez (76,9%) do grupo caso e sete (53,8%) do grupo controle também fizeram uso de cateter urinário antes da positividade da amostra. Para as amostras positivas de urina, 23 (85,2%) do grupo caso e 16 (59,2%) do grupo controle utilizaram cateter urinário. Cinco pacientes do grupo controle não utilizaram cateter venoso nem cateter urinário antes da positividade da amostra, sendo

todas amostras de urina. Desses pacientes que não utilizaram cateteres venoso e urinário, quatro foram diagnosticados com Kp-não-KPC nas primeiras 48 horas de hospitalização e todos vieram de casa.

**Tabela 4. Associação dos grupos e os fatores de risco de infecção analisados no estudo caso-controle.**

Fatores de Risco	Grupos		P <sup>a</sup>
	Caso n (%)	Controle n (%)	
<b>Admissão na UTI</b>	24 (60,0)	13 (32,5)	0,014
<b>Cirurgia durante hospitalização</b>	6 (15,0)	16 (40,0)	0,012
<b>Cateter Venoso</b>	38 (95,0)	31 (77,5)	0,023
<b>Cateter Urinário</b>	33 (82,5)	23 (57,5)	0,015
<b>Ventilação Mecânica</b>	13 (32,5)	8 (20,0)	0,204
<b>Tratamento com Corticosteroides</b>	11 (27,5)	7 (17,5)	0,284

<sup>a</sup>Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fisher.  
Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

Na Tabela 5 estão descritas as RC com o Intervalo de Confiança (IC) de 95% para a associação entre as variáveis que apresentaram diferença significativa nos testes estatísticos. Pacientes admitidos na UTI do HU/UFSC antes da positividade da amostra têm 3,1 vezes mais chance de terem Kp-KPC (RC 3,115 [IC 95%, 1,247-7,781]). Pacientes que fizeram uso de cateter venoso antes da positividade da amostra têm 5,5 vezes mais chance de terem Kp-KPC dos que não utilizaram (RC 5,516 [IC 95%, 1,109-27,429]). Pacientes que fizeram uso de cateter urinário antes da positividade da amostra têm 3,4 vezes mais chance de terem Kp-KPC dos que não utilizaram (RC 3,484 [IC 95%, 1,246-9,747]). Ao contrario dos outros fatores de risco, verificou-se que pacientes que fizeram cirurgia durante a hospitalização tiveram menos chance de terem Kp-KPC.



**Tabela 5. Razões de Chance para os fatores de risco que apresentaram diferença significativa entre os grupos.**

<b>Variável</b>	<b>RC (IC 95%)</b>	<b>P<sup>a</sup></b>
<b>Admissão na UTI</b>	3,115 (1,247-7,781)	0,014
<b>Cirurgia Durante Hospitalização</b>	0,265 (0,090-0,775)	0,012
<b>Cateter Venoso</b>	5,516 (1,109-27,429)	0,023
<b>Cateter Urinário</b>	3,484 (1,246-9,747)	0,015

Razão de Chance (RC); Intervalo de Confiança para RC de 95% (IC 95%)

<sup>a</sup>Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

Na Tabela 6 estão descritas as comorbidades analisadas para cada grupo e o respectivo valor de p, não sendo observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Na Figura 5 estão descritas as unidades de internação no momento da coleta da amostra que foi positiva nos grupos caso e controle.

Observa-se que os pacientes do grupo caso estavam com maior frequência na Clínica Médica (CM), Emergência e UTI, enquanto o grupo controle estava com maior frequência em Ambulatório e Unidade Cirúrgica no momento da coleta da amostra. O HU/UFSC possui atualmente duas CMs (CM I e CM II), sendo a CM II destinada para a especialidade médica onco-hematológica. Havia ainda uma CM III que foi desativada durante o período de estudo. Seis pacientes do grupo caso e cinco pacientes do grupo controle estavam na CM II no momento da coleta da amostra positiva. Como não foi observada grande diferença entre os grupos em relação à unidade de internação nas CMs, principalmente na CM II, optou-se por agrupá-las.

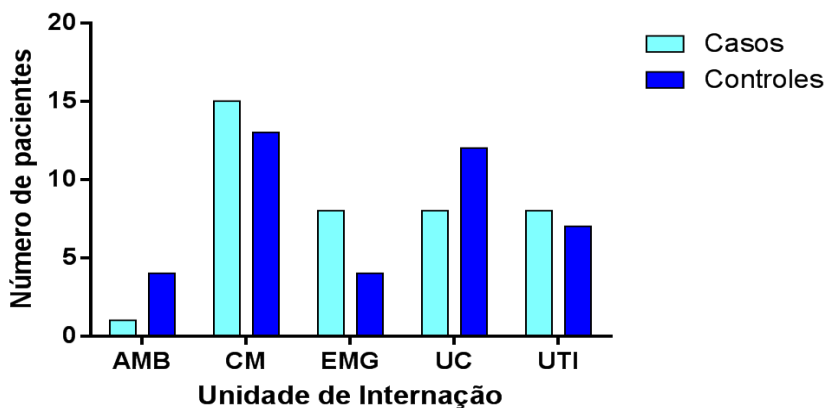
**Tabela 6. Associação dos grupos e as comorbidades analisadas no estudo caso-controle.**

Comorbidades/Alterações laboratoriais	Grupos		P <sup>a</sup>
	Caso n (%)	Controle n (%)	
Disfunção hepática/cirrose	10 (25,0)	12 (30,0)	0,617
Neutrófilos < 1500/mm <sup>3</sup>	2 (5,0)	2 (5,0)	1,000
Infecção por HIV	3 (7,5)	2 (5,0)	0,644
Hemoglobina < 10 g/dL	26 (65,0)	21 (52,5)	0,256
Diabetes	19 (47,5)	15 (37,5)	0,366
Insuficiência Renal	23 (57,5)	19 (47,5)	0,370
Doença cardiopulmonar	29 (72,5)	24 (60,0)	0,237
Transplante	1 (2,5)	3 (7,5)	0,305

<sup>a</sup>Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

**Figura 5. Distribuição de casos e controles nas Unidades de Internação no momento da coleta da amostra.**



AMB, Ambulatório; CM, Clínica Médica; EMG, Emergência; UC, Unidade Cirúrgica; UTI, Unidade de Terapia Intensiva.

Foi observado se os pacientes fizeram uso de algum antibiótico de 48 horas até 30 dias antes da coleta da amostra. Enquanto 50% dos pacientes do grupo controle utilizaram antibióticos antes da coleta, 77,5% do grupo caso fizeram utilização prévia. Houve diferença significativa entre os grupos em relação à utilização de antibióticos antes da coleta ( $P=0,011$ ) (Tabela 7). Como foi observada essa diferença, fez-se uma análise dos antibióticos ou das classes mais utilizadas tanto em monoterapia quanto em associação. Houve diferença significativa entre os grupos em relação ao uso de cefalosporinas de amplo espectro ( $P=0,039$ ), mas a diferença não foi significativa em relação à utilização de quinolonas ( $P=0,057$ ). Apesar disso, parece haver uma tendência a ter uma diferença significativa com relação à utilização de quinolonas. Entre as cefalosporinas de amplo espectro, o uso de ceftriaxona, que foi a cefalosporina mais utilizada nos dois grupos, não apresentou diferença significativa ( $P=0,108$ ). A utilização de carbapenêmicos (meropenem) também não resultou em diferença significativa entre os grupos ( $P=0,201$ ) (Tabela 8).

**Tabela 7. Associação entre os grupos e os antibióticos utilizados antes da positividade da amostra e Razão de Chance.**

Uso de Antimicrobianos	Grupos		RC (IC 95%)	P <sup>a</sup>
	Caso n (%)	Controle n (%)		
<b>Antes da Coleta</b>	31 (77,5)	20 (50,0)	3,444 (1,310-9,058)	0,011

<sup>a</sup>Valor de p para teste Qui-quadrado.

Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

**Tabela 8. Associação entre os grupos e os antibióticos mais utilizados antes da positividade da amostra e RC.**

Antibiótico	Grupos		RC (IC 95%)	P <sup>a</sup>
	Caso n (%)	Controle n (%)		
<b>Cefalosporinas<sup>b</sup></b>	14 (35)	6 (15)	3,051 (1,032-9,022)	0,039
<b>Ceftriaxona</b>	12 (30)	6 (15)	-	0,108
<b>Quinolonas</b>	7 (17,5)	1 (2,5)	-	0,057
<b>Carbapenêmico</b>	5 (12,5)	1 (2,5)	-	0,201

<sup>a</sup>Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

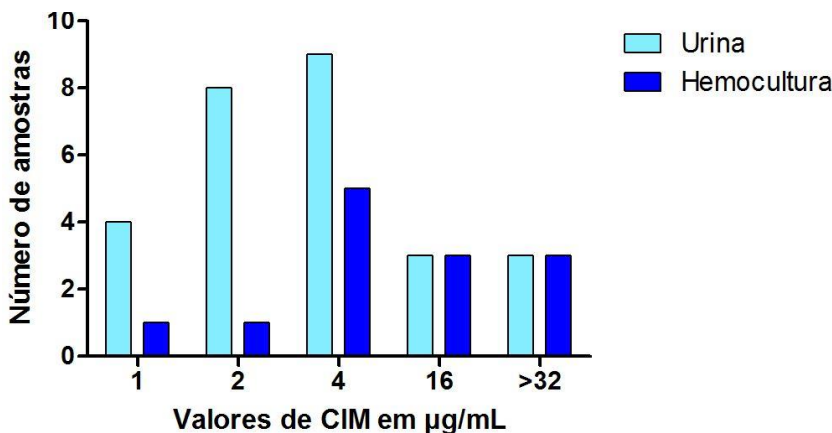
<sup>b</sup>Cefalosporinas de amplo espectro, que foram: ceftriaxona, cefotaxima e cefepime.

Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

Como nenhum protocolo, tanto nacional quanto internacional, para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase foi estabelecido até o momento, foi considerada apropriada a terapia antimicrobiana empírica com administração, dentro de 24 horas do início da infecção, de antimicrobianos que demonstraram posteriormente atividade *in vitro* de acordo com o antibiograma. Tratamento definitivo foi considerado apropriado quando administrado pelo menos um antimicrobiano com atividade *in vitro* segundo resultado do antibiograma. A utilização do meropenem no tratamento de infecções por Kp-KPC foi considerada apropriada quando em tratamento empírico associado com outro antimicrobiano com atividade *in vitro* ou em monoterapia sempre que a concentração inibitória mínima foi menor ou igual a 8 µg/mL ( $CIM \leq 8\mu\text{g/mL}$ ) ou ainda no tratamento definitivo quando associado a outro antimicrobiano com atividade *in vitro* e com  $CIM \leq 8\mu\text{g/mL}$ .

Na Figura 6 estão descritas as CIMs para o meropenem de acordo com sítio anatômico de coleta.

**Figura 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para meropenem de acordo com o sítio anatômico de coleta dos isolados Kp-KPC.**



Desde 2010, o CLSI mudou os pontos de corte da CIM para meropenem. De acordo com os novos critérios interpretativos utilizados para determinação da susceptibilidade ao meropenem, o isolado de *K. pneumoniae* é considerado sensível quando a CIM for igual ou menor que 1 µg/mL, resistência intermediária com CIM igual a 2 µg/mL e resistente quando a CIM for maior ou igual a 4 µg/mL (CLSI, M100-S20-U). Em relação à CIM para meropenem, 53,8% das amostras de hemocultura possuíam valores abaixo de 8 µg/mL, e para as amostras de urina, observou-se prevalência de valores de CIM abaixo de 8 µg/mL (77,8%). Dentre os pacientes que possuíam Kp-KPC com CIM para meropenem acima de 8 µg/mL, 66,7% vieram a óbito.

A análise do tratamento empírico e após o resultado de isolamento e antibiograma foi realizado somente para os pacientes com infecção por Kp-KPC (grupo caso). Dos 40 casos analisados, verificou-se que cinco pacientes com amostra de urina positiva, possivelmente, estavam colonizados por apresentarem crescimento concomitante de outras espécies bacterianas e uma baixa contagem de colônias. Além disso, não utilizaram um tratamento direcionado para Kp-KPC, sendo retirados da análise do tratamento empírico e do tratamento após o antibiograma, entretanto sabe-se que dois desses pacientes vieram a

óbito durante a internação no HU/UFSC. Sete pacientes não fizeram uso de terapia antimicrobiana empírica, desses, cinco (71,4%) foram a óbito durante a internação. Terapia antimicrobiana empírica apropriada (incluía pelo menos um antimicrobiano que posteriormente apresentou atividade *in vitro* para Kp-KPC) foi administrada em 12 dos 28 pacientes restantes, e a mortalidade entre eles foi maior do que a verificada nos pacientes que não receberam terapia empírica apropriada (58,3% e 37,5% respectivamente,  $P=0,445$ ). Somente três casos fizeram associação de antibióticos e todos vieram a óbito. Foram elas: amicacina/polimixina B, meropenem/tigeciclina e meropenem/polimixina B.

Quando analisada a utilização dos antibióticos após o antibiograma, verificou-se que sete pacientes tiveram alta ou foram transferidos e quatro vieram a óbito antes do resultado. Terapia antimicrobiana definitiva foi administrada em 20 dos 24 pacientes restantes. A mortalidade entre os pacientes que receberam terapia antimicrobiana definitiva foi de 55%, relativamente mais alta do que os pacientes que não receberam essa terapia de forma apropriada (50%,  $P=1,000$ ). A associação de antimicrobianos no tratamento definitivo foi administrada em 10 pacientes, e a mortalidade desse grupo foi de 70%, enquanto a mortalidade dos 10 pacientes que fizeram uso de monoterapia foi de 40% ( $P=0,370$ ).

Em relação ao desfecho clínico do paciente, foi observado se o mesmo veio a óbito durante a presente internação no HU/UFSC, não havendo distinção entre os motivos que levaram esses pacientes a óbito. Na alta hospitalar, além das situações em que o paciente obteve alta, estão também incluídas as transferências para outra instituição de saúde. Dentre os 40 pacientes com Kp-KPC, 19 (47,5%) foram a óbito durante a hospitalização (47,4% amostras de hemocultura), enquanto 10 (25,0%) com infecção por Kp-não-KPC foram a óbito (50% amostras de hemocultura) ( $P=0,036$ ) (Tabela 9). Quando analisado o óbito em relação ao sítio anatômico de coleta da amostra verificou-se que, no grupo caso, de todos os pacientes com Kp-KPC na urina, 37% vieram a óbito e dos pacientes com Kp-KPC na hemocultura 69,2% vieram a óbito. Já no grupo controle, dentre as amostras de urina 18,5% foram a óbito e dentre as amostras de hemocultura, 38,5% foram a óbito.

**Tabela 9. Associação entre os grupos e o desfecho dos pacientes incluídos no estudo caso-controle.**

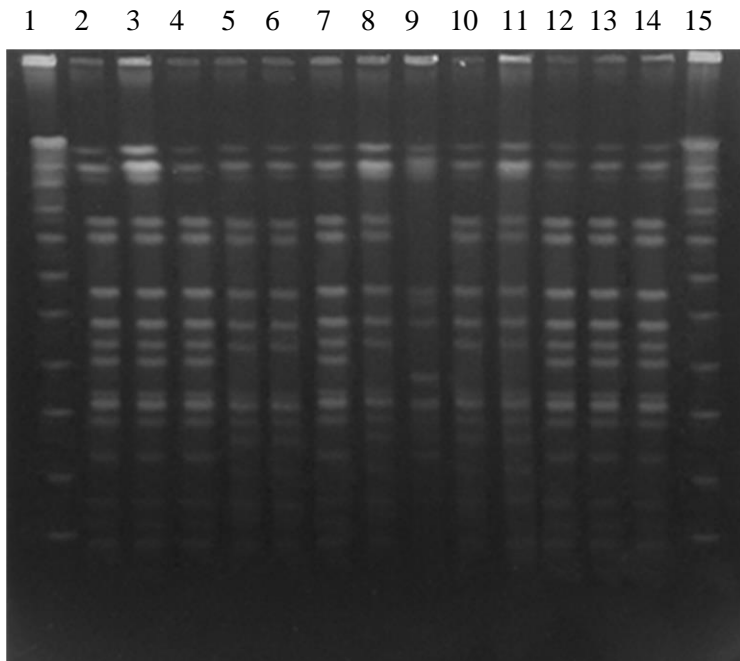
Desfecho	Grupos		P <sup>a</sup>
	Caso n (%)	Controle n (%)	
<b>Alta Hospitalar</b>	21 (52,5%)	30 (75,0%)	-
<b>Óbito</b>	19 (47,5%)	10 (25,0%)	0,036

<sup>a</sup>Valor de p para teste Qui-quadrado.

Foi considerado como significativo um valor de  $P \leq 0,005$ .

A variabilidade genética dos isolados bacterianos, determinada pelo perfil de macrorestrição do cromossomo utilizando a técnica PFGE, foi realizada com 90 amostras dos 181 pacientes infectados/colonizados por Kp-KPC. Dezesete das 90 amostras estão incluídas no estudo caso-controle. Por problemas técnicos apresentados pelo equipamento de eletroforese, não foi possível concluir todas as amostras pretendidas neste estudo. Pela análise das amostras feitas até o momento, observa-se visualmente um padrão de clonalidade na maioria dos isolados testados (Figura 7).

**Figura 7. Isolados de Kp-KPC testados pela técnica PFGE.**



**Canaleta 1 e 15:** Lambda Ladder de 50 kb a 800 kb (ProMega-Markers<sup>®</sup>); **Canaletas 2-14:** amostras de Kp-KPC isoladas de pacientes infectados ou colonizados.



## 7. DISCUSSÃO

O aumento da resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* e sua rápida disseminação, principalmente por Kp-KPC, é um fenômeno emergente de imensa importância na clínica e na saúde pública. O controle da disseminação de KPC torna-se difícil uma vez que os genes codificadores dessa enzima estão localizados em elementos genéticos móveis de plasmídeos conjugativos (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008; CORREA et al., 2013). Além disso, estudos recentes relataram que uma rápida disseminação de KPC está associada a clones de alto risco que estão mundialmente distribuídos e possuem melhor capacidade de adaptação (DOI; PATERSON, 2015). Neste estudo, as amostras foram triadas por dois testes fenotípicos diferentes no período do estudo: MHT e teste com inibidores e potenciador enzimáticos. Este último substituiu o MHT após a publicação da Nota Técnica N° 01/2013. Embora os isolados que apresentem inibição apenas para o AFB já possam ser considerados como produtor de KPC pelo teste recomendado pela ANVISA, todos eles foram confirmados por metodologia molecular (PCR). No HU/UFSC, foi evidenciado um importante aumento do número de casos de Kp-KPC no decorrer do período de estudo, tanto em amostras clínicas quanto nas culturas de vigilância. Em 2012, foram diagnosticados 46 pacientes infectados/colonizados com Kp-KPC, aumentando para 53 em 2013 e 82 no ano de 2014. O aumento observado ao longo desses três anos na instituição evidencia uma falha no processo de contenção da disseminação desse microrganismo, refletindo diretamente na gravidade do problema a ser enfrentado. Por isso, melhorar a detecção precoce com a utilização de testes rápidos para detecção de carbapenemases, aprimorar as medidas específicas já adotadas para prevenção de contato dos pacientes colonizados/infectados e disponibilizar uma terapia antimicrobiana apropriada mais rapidamente, são as principais providências a serem tomadas para o controle da disseminação dentro do ambiente hospitalar. É importante ressaltar que em 2015, apesar de não estar dentro do período de estudo, houve diminuição dos casos de infecção por Kp-KPC no HU/UFSC. De 31 amostras clínicas identificadas no período de 2014, houve uma redução para 17 no ano de 2015. Essa redução reflete algumas medidas adotadas entre 2014 e 2015, como a disponibilização de uma ala hospitalar destinada ao isolamento de pacientes colonizados ou infectados por bactérias multirresistentes e troca de desinfetante utilizado para higienização de superfícies e do antisséptico utilizado pré-

procedimentos. Esses dados foram fornecidos pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH/HU/UFSC) (Dados não publicados).

A maioria das bactérias Kp-KPC foi isolada de cultura de vigilância (*swab* retal) durante os três anos do estudo. Embora não sejam pacientes com algum processo de infecção, estavam colonizados de forma assintomática, constituindo um importante reservatório para transmissão. Estudo conduzido por Calfee e Jekins em 2008 observou uma alta taxa de bacteremia por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (Kp-RC) entre pacientes de uma UTI que foram previamente colonizados por essas bactérias. A disseminação das bactérias no ambiente hospitalar está fortemente relacionada ao contato com pacientes colonizados/infectados, por meio direto (paciente/paciente) ou indireto (paciente/profissional de saúde, paciente/equipamentos). Em virtude disso, a identificação de pacientes colonizados, seu isolamento e a precaução de contato são medidas necessárias a fim de conter a disseminação de bactérias multirresistentes no hospital (SIEGEL et al., 2007). No HU/UFSC, são solicitadas culturas de vigilância nos seguintes casos: detecção de isolados positivos no mesmo quarto para qualquer unidade de internação; pacientes da UTI, no momento de admissão e na saída, e todas as segundas-feiras durante o período de internação. Nesses casos são coletadas amostras de *swab* retal. Para os transferidos de outras unidades de saúde nas quais tenham permanecido por mais de 24 horas e que passaram por procedimentos invasivos, são coletadas amostras de *swab* retal, secreção traqueal em presença de traqueostomia ou Tubo Oro-Traqueal (TOT), urina e feridas. Nos pacientes com doenças onco-hematológicas, as culturas de vigilância foram introduzidas como rotina em 2012, e são realizadas semanalmente. A precaução de contato para bactérias multirresistentes ocorre quando há histórico de colonização/infecção por essas bactérias ou em casos de abscessos ou feridas com drenagem de secreção não contida pelo curativo (SIEGEL et al., 2007; SCIH, 2015).

Os prontuários disponibilizados no HU/UFSC para a pesquisa dos dados dos pacientes no estudo caso-controle são prontuários físicos. Diferentemente da pesquisa por meio eletrônico, como observado em alguns estudos (GASINK et al., 2009; HUSSEIN et al., 2009; TUON et al., 2012), os prontuários físicos muitas vezes não possuem uma uniformidade nos dados fornecidos, gerando maior dificuldade e tempo mais prolongado para sua leitura e coleta dos dados necessários. Apesar

disso, conseguiu-se a coleta de todas as informações nos prontuários incluídos no estudo, sem nenhuma perda.

O pareamento das amostras foi realizado utilizando-se quatro critérios: idade do paciente, gênero, sítio de coleta e data da positividade da amostra. Com base nesses critérios, conseguiu-se correlacionar todos os pacientes por gênero, sítio de coleta e data da positividade da amostra, sendo essa última com o máximo de cinco meses de intervalo entre os pacientes caso e controle. Embora o critério adotado em relação à idade dos pacientes fosse uma diferença de até dez anos, a diferença máxima encontrada foi de oito anos e aconteceu em apenas dois casos. Como a idade era um critério de pareamento, a média de idade entre os grupos foi praticamente idêntica e muito similar com a encontrada em estudos anteriores para o grupo caso (PATEL et al., 2008; NGUYEN et al., 2010; ZARKOTOU et al., 2011; TUON et al., 2012). As amostras incluídas no estudo caso-controle foram 27 de urina e 13 de hemocultura para cada grupo. Essas amostras representaram 27,7% e 10,3% respectivamente, do total de isolados Kp-KPC e foram as principais amostras clínicas representativas de infecção detectadas durante o período de estudo. No estudo conduzido por Gasink e colaboradores (2009), as principais amostras clínicas de isolados de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foram urina e hemocultura (59,9% e 17,3% respectivamente), sendo também observado no estudo realizado por Correa e colaboradores (2013).

Os pacientes do estudo caso-controle foram predominantemente do gênero masculino (72,5%). Isso poderia representar um viés no estudo, uma vez que alguns prontuários não foram analisados por se enquadrarem em algum critério de exclusão. Apesar disso, dentre os 181 pacientes que apresentaram um ou mais episódios de Kp-KPC no período do estudo, 67,4% eram do gênero masculino, mostrando uma predominância de Kp-KPC nesse gênero. Além disso, outros estudos relataram predominância de pessoas do gênero masculino, variando de 61,1% a 69,3% (HUSSEIN et al., 2009; ZARKOTOU et al., 2010; NGUYEN et al., 2010; ZARKOTOU et al., 2011; TUON et al., 2012; CORREA et al., 2013).

A maioria dos pacientes que vieram de transferência de outra instituição de saúde pertencia ao grupo caso, sendo observada uma diferença significativa entre os grupos quando comparado se o paciente veio ou não transferido de outra instituição hospitalar para o HU/UFSC ( $P=0,010$ ). Resultados similares foram encontrados em outros estudos. Gasink e colaboradores, em 2009, observaram que 35,7% dos pacientes com Kp-KPC e 17,7% com Kp-não-KPC foram transferidos ( $p<0,001$ ).

Zarkotou e colaboradores (2010) também encontraram diferença significativa entre os pacientes-caso e controle quanto à origem no momento da admissão. Enterobactérias produtoras de carbapenemase parecem ter um alto potencial de disseminação não apenas de um paciente para outro dentro de um ambiente hospitalar, mas também através de transferências entre instituições de saúde da mesma região (WON et al., 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012). Pacientes transferidos geralmente possuem mais comorbidades, o que foi encontrado na maioria nos pacientes com infecção por Kp-KPC deste estudo. Já a maioria dos pacientes que vieram de casa para o HU/UFSC pertencia ao grupo controle. Dentro do grupo controle, 87,5% tiveram origem de casa, sendo este grupo composto por pacientes que possuíam, em geral, menos comorbidades. Dos pacientes que vieram de casa e tiveram um episódio de infecção por Kp-KPC, 68% tiveram uma internação hospitalar prévia, até 90 dias antes da admissão no HU/UFSC. Quatro pacientes do grupo caso foram diagnosticados com Kp-KPC no momento da admissão no HU/UFSC, indicando que muito provavelmente o isolado foi adquirido em outra instituição de saúde. As infecções causadas por microrganismos multirresistentes, neste caso por Kp-KPC, são associadas ao ambiente hospitalar, sendo raramente encontradas na comunidade (TZOUVELEKIS et al., 2012). Esses resultados encontrados reforçam a importância da realização de cultura de vigilância no momento da admissão de todos os pacientes transferidos de outras unidades de saúde.

Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa no tempo de hospitalização antes do isolamento de *K. pneumoniae* entre os grupos ( $P=0,073$ ), foi observado que a mediana desse tempo para o grupo caso (18 dias) foi maior do que para o grupo controle (7,5 dias). Tempos de hospitalização mais prolongados, desde a admissão até o isolamento de *K. pneumoniae* foram associados com aumento do risco de infecções por Kp-KPC (GASINK et al., 2009). Outro estudo também mostra maior tempo de hospitalização para os pacientes com infecção por Kp-KPC, embora não tenha encontrado diferença significativa entre os grupos (FALAGAS et al., 2007). Confirmando que quanto maior o tempo de hospitalização maior o tempo de exposição aos mais variados fatores de risco para infecções ou colonizações por microrganismos multirresistentes.

A avaliação por análise univariada dos fatores que podem predizer risco para aquisição de infecções hospitalares demonstrou que admissão na UTI e o uso de cateteres, tanto venoso quanto urinário, antes da positividade da amostra foram associados com infecção por Kp-

KPC. Estudos anteriores que também compararam amostras Kp-KPC (caso) e Kp-não-KPC (controle) encontraram as mesmas associações (GASINK et al., 2009; TUON et al., 2012). Gasink e colaboradores (2009) estudaram amostras representativas de infecção e colonização e verificaram que a utilização de ventilação mecânica foi um fator de risco para Kp-KPC, assim como Tuon e colaboradores (2012), que estudaram amostras de hemocultura. O uso da ventilação mecânica como fator de risco para Kp-KPC foi também observado em estudos que utilizaram amostras de Kp-RC (FALAGAS et al., 2007; PATEL et al., 2008; HUSSEIN et al., 2009). No presente estudo, 32,5% dos pacientes do grupo caso e 20% do grupo controle utilizaram ventilação mecânica antes da coleta, mas não foi encontrada significância ( $P=0,204$ ). Todos os pacientes que tiveram positividade para Kp-KPC na amostra de hemocultura utilizaram cateter venoso antes da coleta e a maioria também estava em uso de cateter urinário. A presença de dispositivos invasivos mostrou ser uma importante fonte de aquisição de infecções por Kp-KPC no HU/UFSC. Segundo CDC (2015) minimizar o uso desses dispositivos é um passo importante no esforço de reduzir a incidência dessas infecções. Em hospitais que fazem internações mais longas, o uso do dispositivo deve ser revisto regularmente para verificar se ele ainda é necessário e, se não for, seu uso deve ser descontinuado prontamente. O uso de corticosteroides previamente à coleta da amostra foi feito por 27,5% dos pacientes-caso e por 17,5% dos pacientes-controle, mas também não mostrou ser um fator de risco para Kp-KPC neste estudo, assim como observado em dois estudos anteriores (HUSSEIN et al., 2009; CORREA et al., 2013). Foi observada diferença significativa, entre os grupos, associada à realização de cirurgia antes da positividade da amostra no HU/UFSC. Outros estudos demonstram que a cirurgia anterior ao isolamento de *K. pneumoniae* é fator de risco para Kp-RC (GASINK et al., 2009; PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2014). Interessantemente no presente estudo, a diferença foi associada ao grupo controle, ou seja, os pacientes com infecção por *K. pneumoniae* não produtoras de carbapenemase fizeram mais cirurgia do que os pacientes do grupo caso. Ao buscar os dados nos prontuários, observou-se que grande parte dos pacientes do grupo controle foi internada no HU/UFSC para realização de cirurgia eletiva. Porém, esses dados não foram contabilizados e, por isso, não foram descritos nos resultados do estudo. Além disso, o tempo médio de permanência dos pacientes na Unidade Cirúrgica do HU/UFSC é ligeiramente menor do que o observado na UTI. Em 2012, esse tempo foi de 6,26 dias na Unidade Cirúrgica e 6,37 dias na UTI; em 2013, 5,94 e 6,16 dias; e em

2014, 5,92 e 6,82 dias respectivamente (Dados fornecidos pela CCIH/HU/UFSC, não publicados). Como a maioria dos pacientes do grupo controle internou na Unidade Cirúrgica, provavelmente tiveram um tempo de internação total menor em relação aos pacientes internados na UTI e foram expostos a menos fatores de riscos de infecções.

Neste estudo, foram avaliadas algumas comorbidades que poderiam estar relacionadas com infecções por Kp-KPC nos pacientes do HU/UFSC. Além da análise individual de determinadas comorbidades, diversos estudos avaliam o índice de comorbidade e o nível de severidade de doença por sistemas de pontuação e classificação (FALAGAS et al., 2007; HUSSEIN et al., 2009; CORREA et al., 2013; GIACOBBE et al., 2015). No presente estudo, os dados dos pacientes-caso e controle foram coletados de forma retrospectiva, e algumas variáveis como o índice de comorbidade e o nível de severidade da doença não puderam ser precisamente avaliados. Pacientes do grupo caso possuíam com frequência maior que o grupo controle as seguintes comorbidades analisadas: infecção pelo HIV, anemia, diabetes, insuficiência renal e doença cardiopulmonar. No entanto, não foram observadas diferenças significativas para nenhuma dessas condições, corroborando com os resultados encontrados em outros estudos (FALAGAS et al., 2007; GASINK et al., 2009; HUSSEIN et al., 2009; CORREA et al., 2013).

Os pacientes com infecção por Kp-KPC estavam com maior frequência nas CMs, Emergência e UTI, enquanto os pacientes do grupo controle estavam com maior predominância no Ambulatório e Unidade Cirúrgica no momento da coleta da amostra. Ainda que as amostras tenham sido coletadas nessas unidades, muitos pacientes estiveram anteriormente internados em outras unidades do HU/UFSC. Como esses dados não foram analisados neste estudo, não é possível estabelecer uma relação entre aquisição da bactéria e unidade de internação. O grupo controle foi mais predominante na Unidade Cirúrgica, corroborando com o fato de que realizaram mais cirurgia durante a internação do que o grupo caso. No início do estudo havia três Clínicas Médicas (CM) no HU/UFSC: CM I, CM II e CM III. As CMs I e III recebiam pacientes das diversas especialidades médicas, enquanto a CM II recebia pacientes da especialidade onco-hematológica. Durante o período de estudo, a CM III foi desativada, e até o final de 2014 não havia uma ala hospitalar específica para isolamento de pacientes colonizados/infectados por bactérias multirresistentes. Somente em março/abril de 2015 a CM I passou a receber os pacientes colonizados/infectados por bactérias multirresistentes para isolamento. Segundo Tzouveleakis e colaboradores

(2012) quando um isolado produtor de carbapenemase é identificado, o controle de infecção hospitalar deve ser notificado imediatamente. No HU/UFSC a comunicação entre o setor de microbiologia e a CCIH/HU/UFSC para notificação desses casos ocorre por meio de relatórios diários e comunicação direta. O isolamento ou agrupamento de pacientes infectados/colonizados com Enterobactérias produtoras de carbapenemase parece ser a melhor medida de prevenção da disseminação (HERBERT et al., 2007; ENDIMIANI et al., 2009; KOCHAR et al., 2009; CARBONNE et al., 2010; GREGORY et al., 2010; MUNOZ-PRICE, 2010; SCHWABER et al., 2011). Por essa e por outras razões já elencadas, o isolamento de Enterobactérias produtoras de KPC mostrou uma redução no ano de 2015.

Diversos estudos do tipo caso-controle têm demonstrado que uma grande quantidade de classes de antibióticos utilizadas no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas podem contribuir para seleção de Enterobactérias produtoras de carbapenemase (KWAK et al., 2005; FALAGAS et al., 2007; JEON et al., 2008; PATEL et al., 2008; GASINK et al., 2009; HUSSEIN et al., 2009; DAIKOS et al., 2010; WIENER-WELL et al., 2010; CORREA et al., 2013). Segundo Tzouveleakis e colaboradores (2012), o que parece ter mais importância é a maior exposição anterior aos antimicrobianos em geral, e não apenas a utilização de uma classe específica ou por maior tempo (DAIKOS et al., 2010; CORREA et al., 2013). Diversos estudos relatam, no entanto, que a exposição prévia principalmente a fluoroquinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro está associada a um aumento de risco de infecções por Kp-RC (FALAGAS et al., 2007; PATEL et al., 2008; GASINK et al., 2009; TUON et al., 2012; GIACOBBE et al., 2015). Neste estudo, a exposição prévia às principais classes de antibióticos com atividade em bactérias Gram-negativas, mostrou ser um fator de risco para Kp-KPC por análise univariada ( $P=0,011$ ). Pacientes que fizeram utilização prévia de antibióticos possuem 3,1 vezes mais chance de terem infecção por Kp-KPC (RC 3,444 [IC95% 1,310-9,058]). Quando realizada uma análise univariada individual, observou-se neste estudo que a utilização de cefalosporinas de amplo espectro está associada com um aumento no risco de infecção por Kp-KPC ( $P=0,039$ ), mas não houve diferença significativa para a utilização de quinolonas ( $P=0,057$ ) e especificamente a ceftriaxona ( $P=0,108$ ), que foi a cefalosporina de amplo espectro mais utilizada no período de estudo. Uma diferença significativa para a utilização de cefalosporinas foi observada por Kwak e colaboradores em 2005 e Patel e colaboradores em 2008, com amostras de Kp-RC, bem como por Gasink e

colaboradores em 2009, com amostras de Kp-KPC. Além disso, não foi encontrada diferença significativa para o meropenem ( $P=0,210$ ). Embora a utilização de quinolonas e carbapenêmicos tenha sido associada com aumento de risco para infecções por Kp-RC, apenas 17,5% e 2,5% dos grupos caso e controle, respectivamente, utilizaram quinolonas e 12,5% e 2,5% dos grupos caso e controle utilizaram carbapenêmicos (meropenem), respectivamente. Entretanto, bactérias produtoras de enzimas KPC conferem um nível de resistência maior às cefalosporinas do que aos carbapenêmicos e, portanto, uma pressão seletiva pelas cefalosporinas é justificável (WOODFORD et al., 2004).

O aumento da prevalência de infecções severas causadas por microrganismos produtores de KPC, associado a altos índices de mortalidade, ressalta a necessidade para a busca de um tratamento efetivo. No entanto, o tratamento apropriado para infecções causadas por esses microrganismos ainda não foi estabelecido (CARMELI et al., 2010; HIRSCH; TAM, 2010; ZARKOTOU et al., 2011; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). A maior parte dos dados clínicos sobre a eficácia dos antibióticos no tratamento de produtores de carbapenemase é de relatos de casos e séries de casos, principalmente por Kp-KPC (FALAGAS et al., 2014). A fim de investigar mais profundamente a mortalidade dos pacientes do grupo caso, foram avaliadas as intervenções terapêuticas no tratamento empírico e após resultado de antibiograma. Para isso, a utilização considerada apropriada ou não para cada tratamento foi comparada com desfecho dos pacientes do grupo caso. A terapia antimicrobiana empírica não mostrou ter um impacto no desfecho dos pacientes quando comparada se sua utilização foi ou não apropriada. Mais pacientes que utilizaram uma terapia empírica apropriada vieram a óbito em relação aos que a utilizaram de forma inapropriada (58,3% e 37,5% respectivamente,  $P=0,445$ ). Apesar disso, uma grande maioria (71,4%) dos pacientes que não fizeram uso da terapia empírica veio a óbito durante a internação. Interessantemente, os únicos três casos que utilizaram uma associação de antibióticos na terapia empírica foram a óbito durante a internação. Os quatro pacientes que vieram a óbito antes do resultado do antibiograma utilizaram como terapia empírica meropenem/polimixina B, piperacilina/tazobactam, meropenem e um deles não fez uso de terapia empírica. A mortalidade, quando utilizada terapia com pelo menos um antimicrobiano com atividade *in vitro* a partir do antibiograma, foi maior do que quando o paciente fez uso de terapia não apropriada (55% e 50% respectivamente). Apesar disso, esse fator não esteve associado com a sobrevida do paciente ( $P=1,000$ ). Embora a maioria dos estudos clínicos



relatarem uma menor taxa de mortalidade para os pacientes que utilizaram terapia combinada (ZAVASCKI; BULITTA; LANDERSDORFER, 2013; DAIKOS et al., 2014; TZOUVELEKIS et al., 2014), este estudo demonstrou que a taxa de mortalidade dos pacientes que utilizaram uma terapia combinada foi maior do que os pacientes que utilizaram monoterapia. A CIM para o meropenem, carbapenêmico de escolha utilizado no HU/UFSC durante o período do estudo, variou conforme a amostra clínica. Observou-se predominância das amostras de urina com uma CIM para o meropenem menor que 8 µg/mL (77,8%). A taxa de mortalidade entre os pacientes que possuíam Kp-KPC com uma CIM para meropenem maior que 8 µg/mL foi de 66,7%, considerando amostras de urina e hemocultura, apesar de nem todos os pacientes terem utilizado meropenem no tratamento dessas infecções.

A análise dos dados sobre a evolução das infecções no decorrer da internação hospitalar no HU/UFSC revelou que os pacientes com Kp-KPC tiveram uma mortalidade mais elevada em comparação com os pacientes infectados com Kp-não-KPC (47,5% e 25,0% respectivamente), sendo esta diferença significativa ( $P=0,036$ ). A mortalidade entre os pacientes com episódios de Kp-RC tem uma variação de aproximadamente 30% a 52,8% (FALAGAS et al., 2007; BORER et al., 2009; GASINK et al., 2009; ZARKOTOU et al., 2011; GIACOBBE et al., 2015). Embora alguns desses estudos incluíssem isolados de Kp-RC, mas não produtoras de KPC, eles obtiveram resultados semelhantes, com os encontrados no presente estudo, em termos de mortalidade. Um estudo conduzido por Zarkotou e colaboradores em 2010 observou um índice de mortalidade mais alto: 69,2% quando analisaram pacientes colonizados ou infectados por Kp-KPC e 75% quando foram analisados somente os casos de infecção. Apesar disso, a amostragem desses autores foi constituída de apenas 13 pacientes com Kp-KPC. O desfecho clínico observado em dois estudos caso-controle foi muito similar a este estudo, tanto para o grupo caso quanto para o grupo controle. Patel e colaboradores, em 2008, encontraram uma mortalidade caso e controle de 48% e 26% respectivamente e Correa e colaboradores, em 2013, observaram uma mortalidade caso e controle de 50% e 27,5% respectivamente. Esses estudos utilizaram isolados de Kp-RC obtidos de amostras clínicas de hemocultura e outros sítios anatômicos considerados estéreis. Quando observada a mortalidade dos pacientes em relação ao sítio anatômico de coleta da amostra positiva, verificou-se, no presente estudo, que o óbito foi maior no grupo caso do que no grupo controle quando analisadas

somente as amostras de hemocultura (69,2% e 38,5%) e quando analisadas somente as amostras de urina (37% e 18,5%).

Por problemas no equipamento de eletroforese, a análise da variabilidade genética dos isolados bacterianos pela técnica PFGE não pôde ser finalizada. Aproximadamente metade das amostras foi concluída. Entretanto, embora não tenha sido realizada uma análise por *softwares* de similaridade de géis, observa-se visualmente um padrão de clonalidade na grande maioria dos isolados já testados.

## 8. CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo caso-controle com amostras de bactérias produtoras de KPC no HU/UFSC. Estudos como este são importantes na identificação de fatores de risco de infecções a fim de auxiliar a seleção de pacientes que devem receber um tratamento empírico diferenciado. Kp-KPC é um patógeno emergente associado com significativa mortalidade nesta instituição hospitalar. O número de Kp-KPC isolados, tanto em amostras clínicas quanto em amostras de culturas de vigilância, na instituição, demonstra a necessidade do aprimoramento constante das medidas de prevenção e controle de infecção por esse tipo de microrganismo. A transferência de pacientes para o HU/UFSC mostrou ter associação com os casos de Kp-KPC. Isso enfatiza a importância de manter a coleta de amostras para realização de culturas de vigilância no momento da admissão dos pacientes transferidos de outras instituições de saúde. O uso de cateteres venoso e urinário revelou ser um importante fator de risco para infecções por Kp-KPC e, portanto, minimizar o uso desses dispositivos, quando possível, pode auxiliar na redução dessas infecções. Mais estudos sobre os fatores de risco e tratamento são necessários para um melhor entendimento dos determinantes epidemiológicos de disseminação desses microrganismos e para aperfeiçoar a terapia empírica em grupos de alto risco.



## 9. PERSPECTIVAS

- Concluir a análise da variabilidade genética dos 91 isolados restantes pela técnica PFGE;
- Realizar uma análise de similaridade entre os perfis encontrados, com geração de dendrograma a partir de determinados *softwares* (Gel-Pro Analyser 4.0 e NTSYS 2.02);
- Realizar um estudo genético mais aprofundado sobre esses e outros isolados de Kp-KPC circulantes no HU/UFSC.



## REFERÊNCIAS

**Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).** Nota Técnica nº 01/2013 Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes, 2013.

AMBLER, R. P. The Structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANDERSON, K. F. et al. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, 2007.

BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-15, 2013.

BOGAERTS, P. et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 361-376, 2010.

BORER, A. et al. Attributable Mortality Rate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 10, p. 972-976, 2009.

BORER, A. et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. **American Journal of Infection Control**, v. 40, p. 421-425, 2012.

BOYLE, D. P.; ZEMBOWER, T. R. Epidemiology and Management of Emerging Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and Beyond. **Urologic Clinics of North America**, v. 42, p. 493-505, 2015.

BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30  $\beta$ -Lactamases in New York City. **Infectious Diseases Society of America**, v. 39, p. 55-60, 2004.

BRATU, S. et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3018-3020, 2005.

BRATU, S. et al. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. **Archives Of Internal Medicine**, v. 165, n. 12, p. 1430-1435, 2005.

BRATU, S. et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 972–975, 2007.

BRATU, S. et al. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, p. 776-778, 2005.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000Prime Reports**, v. 6, p. 64, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and its correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CALFEE, D.; JENKINS, S. G. Use of Active Surveillance Cultures to Detect Asymptomatic Colonization With Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Unit Patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 10, p. 966-968, 2008.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 298-304, 2013.



CARBONNE, A. et al. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. **EuroSurveillance**, v. 15, n. 48, p. 1-6, 2010.

CARMELI, Y. et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 102-111, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase- and Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 570-573, 2008.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, Georgia; **US Department of Health and Human Services, CDC**, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). Atlanta, Georgia; **US Department of Health and Human Services, CDC**, 2015.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. **CLSI document M100-S20-U**. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2010.

CORREA, L. et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 80, p. 1-8, 2013.

CURY, A. P. et al. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Clinical Science**, v. 67, n. 12, p. 1427-1431, 2012.

D'ALLINCOURT, A. P. et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p. 337-338, 2010.

DAIKOS, G. L. et al. Risk factors for bloodstream infection with *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 784-788, 2010.

DAIKOS, G. L. et al. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. **Expert Review Anti Infective Therapy**, v. 10, p. 1393-1404, 2012.

DAIKOS, G. L. et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes and the Role of Carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2322-2328, 2014.

DESHPANDE L. M. et al. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 56, p. 367-372, 2006.

DIJKSHOORN, L.; URSING, B. M.; URSING, J. B. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 397-401, 2000.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, p. 74-84, 2015.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.12, p. 6437-6440, 2012.

DOYLE, D. et al. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

ENDIMIANI, A. et al. Emergence of *bla*<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 1102-1110, 2009.

ENDIMIANI, A. et al. Characterization of *bla* KPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 427-437, 2009.

EUZÉBY J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592, 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

FALAGAS, M. E. et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case-control study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1124-1130, 2007.

FALAGAS, M. E. et al. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Systematic Evaluation of the Available Evidence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 654-663, 2014.

FELDMAN, N. et al. Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. 190-196, 2012.

GALES A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354-360, 2012.

GARCIA, L. S.; ISEMBERG, H. D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., **Washington, D.C. American Society for Microbiology**, 2010.

GASINK, L. B. et al. Risk Factors and Clinical Impact of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 12, p. 1-10, 2009.

GIACOBBE, D. R. et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 12, p. 1106.e1-1106.e8, 2015.

GIAKOUPI, P. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. **Euro Surveillance**, v. 14, n. 21, 2009.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. CTX-M Expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 832-834, 2009.

GREGORY, C. J. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 5, p. 476-484, 2010.

HAMMERUM, A. M. et al. Detection of the first two *Klebsiella pneumoniae* isolates with sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Denmark. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 6, p. 610-612, 2010.

HANSEN, D. S.; GOTTSCHAU, A.; KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **Journal Of Hospital Infection**, v. 38, n. 2, p. 119-132, 1998.

HERBERT, S. et al. Large outbreak of infection and colonization with gram-negative pathogens carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP-4</sub> at a 320-bed tertiary hospital in Australia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 1, p. 98-101, 2007.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of

multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 1, p. 1119-1125, 2010.

HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **American Journal of Infection Control**, v. 36, n. 5, p. 309-332, 2008.

HUSSEIN, K. et al. Carbapenem Resistance Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates: Risk Factors, Molecular Characteristics, and Susceptibility Patterns. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 7, p. 666-671, 2009.

JAIN, R. et al. Emergence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 258 in Michigan, USA. **Infectious Disease Reports**, v. 5, n. 1, p. 16-20, 2013.

JEON, M. H. et al. Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Escherichia coli* among hospitalized patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 402-406, 2008.

KARAISKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 10, p. 1351-1370, 2014.

KANG, C. I. et al. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, v. 11, n. 1, p. 68-74, 2005.

KITCHEL, B. et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, p. 3365-3370, 2009.

KITCHEL, B. et al. Genetic Factors Associated with Elevated Carbapenem Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4201-4207, 2010.

KOCHAR, S. et al. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Infection control and Hospital Epidemiology**, v. 30, p. 447-452, 2009.

KWAK, Y. G. et al. Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among hospitalized patients. **Microbial Drug Resistance**, v. 11, p. 165-169, 2005.

LASCOLS, C. et al. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 130-136, 2013.

LEAVITT, A. et al. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 51, p. 3026-3029, 2007.

LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 32, p. 1-9, 2012.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, GMI**, v. 7, p. 88-102, 2001.

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413-420, 2006.

MAGALHÃES, V. D. et al. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 155-161, 2005.

MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, p. 261-268, 2004.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.

MONTEIRO J. et al. First report of KPC-2-producing-*Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, p. 333-334, 2009.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31, p. 341-347, 2010.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

NAAS, T. et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, p. 4423-4424, 2005.

NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -Lactamase *bla*<sub>KPC</sub> Gene. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.

NAVON-VENEZIA, S. et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 818-820, 2009.

NGUYEN, M. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 180-184, 2010.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002.

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. **Future Microbiology**, v. 2, n.3, p. 297-307, 2007.

NORDMANN P.; CUZON G.; NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263-272, 2012.

NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 432-438, 2012.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Risk factors for infection and predictors of mortality among patients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in the intensive care unit. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 46, p. 642-648, 2014.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PASTERAN, F. G. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1178-1180, 2008.

PATEL, G. et al. Outcomes of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and the Impact of Antimicrobial and Adjunctive Therapies. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 12, p. 1099-1106, 2008.



PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, p. 2702, 2009.

PECORA, N. D. et al. Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System. **Genomically Informed Pathogen Surveillance**, v. 6, n. 4, p. 1-11, 2015.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 265-268, 2009.

PHILIPPON, A. et al. A Structure-Based Classification of Class A-Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 29-57, 2015.

PIRES, J.; NOVAIS, Â.; PEIXE, L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, 2013.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

RASHEED, J. K. et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Type 2 Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme in Clinical Isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* Carrying a Common Plasmid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2066-2069, 2008.

ROBERTS, R. R. et al. Hospital and Societal Costs of Antimicrobial-Resistant Infections in a Chicago Teaching Hospital: Implications for Antibiotic Stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1175-1184, 2009.

RODLOFF, A. C.; GOLDSTEIN, E. J. C.; TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 916-929, 2006.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 5, p. 337.e1-337.e21, 2015.

SACHA, P. et al. The KPC type  $\beta$ -lactamases: new enzymes tha confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 47, n. 4, p. 537-543, 2009.

SCHECHNER, V. et al. Asymptomatic rectal carriage of *bla*<sub>KPC</sub> producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 451-456, 2012.

SCHÖRNER, M. A. et al. Análise dos primeiros casos de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. **Resumo apresentado na forma de pôster no 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Natal, 2013.**

SCHWABER, M. J. et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, p. 848-855, 2011.

SCIH. Serviço de Controle de Infecção Hospitalar. Plano de Contenção de Disseminação de Bactérias Multirresistentes e Unidade de Isolamento. **Hospital Universitário Prof. Dr. Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC**. SCIH, 2015. Disponível em: < <http://www.hu.ufsc.br/setores/ccih/wp-content/uploads/sites/16/2015/10/Plano-de-Conten%C3%A7%C3%A3o-de-Dissemina%C3%A7%C3%A3o-de-Bact%C3%A9rias-Multiresistentes-e-Unidade-de-Isolamento.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

SIEGEL, J. D. et al. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Atlanta, Georgia; **US Department of Health and Human Services, CDC**, 2007.

SILVA, R. M.; TRAEBERT, J.; GALATO, D. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 6, p. 663-671, 2012.

SPRATT, B. G. Exploring the concept of clonality in bacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 266, p. 323-352, 2004.

TÄNGDÉN, T.; GISKE, C. G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, p. 501-512, 2015.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TOFTELAND, S. et al. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013.

TREVISAN, V. Caratteri di alcuni nuovi generi di Batteriacee. **Atti della Accademia Fisica-Medica-Statistica in Milano (ser 4)**, v. 3, p. 92-107, 1885.

TUON, F. F. et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 416-419, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 862-872, 2014.

VARDAKAS, K. Z. et al. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2793-2803, 2012.

VILLEGAS, M. V. et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, p. 2880-2882, 2006.

VILLEGAS, M. V. et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 470-482, 2007.

WARNES, S. L.; HIGHMORE, C. J.; KEEVIL, C. W. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes on Abiotic Touch Surfaces: Implications for Public Health. **Mbio**, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2012.

WEI, Z.-Q. et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 51, p. 763-765, 2007.

WERNLI, D. et al. A Call for Action: The Application of the International Health Regulations to the Global Threat of Antimicrobial Resistance. **Plos Medicine**, v. 8, p. 1-6, 2011.

WIENER-WELL, Y. et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, p. 344-349, 2010.

WON, S. Y. et al. Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 6, p. 532-540, 2011.

WOODFORD, N. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A  $\beta$ -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4793-4799, 2004.

WOODFORD, N. et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1261-1264, 2008.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 736-755, 2011.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta- lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

ZARKOTOU, O. et al. Risk Factors and Outcomes Associated with Acquisition of Colistin-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: a Matched Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2271-2274, 2010.

ZARKOTOU, O. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 12, p. 1798-1803, 2011.

ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 286-288, 2009.

ZAVASCKI, A. P.; BULITTA, J. B.; LANDERSDORFER, C. B. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 12, p. 1333-1353, 2013.

## **ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – CEPSH**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O(a) senhor(a), seu familiar e/ou dependente, está sendo convidado a participar, como voluntário(a), de uma pesquisa intitulada “Estudo caso-controle dos aspectos clínicos, fatores de risco e mortalidade associados a infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC”. A pesquisa tem como objetivo avaliar os fatores associados às infecções por este tipo de bactéria que é resistente à maioria das medicações e muito letal, comparando com fatores associados a infecções por bactérias do mesmo tipo, mas não resistentes aos antibióticos.

Nesse estudo serão utilizados dados do seu prontuário médico, da época em que o Sr.(a) esteve internado no Hospital Universitário e realizados exames nas bactérias que foram isoladas na época.

O Sr.(a) não precisará se deslocar até o Hospital Universitário, e não será submetido a nenhum tipo de exame. Apenas os dados do seu prontuário médico serão utilizados.

Os benefícios e vantagens em participar deste estudo serão que com os resultados obtidos nas avaliações, os profissionais de saúde poderão avaliar e conhecer os fatores relacionados a este tipo de infecção e proporcionar um diagnóstico mais rápido e um tratamento mais adequado nos casos que venham a ocorrer no futuro.

O senhor(a) está isento de qualquer despesa tida pelos pesquisadores do presente estudo e dele decorrentes, e garante-se indenização decorrente de eventuais danos gerados pela pesquisa.

As pessoas que terão contato com seu prontuário médico serão somente os pesquisadores Profa. Maria Luiza Bazzo, Mara Scheffer, Marcos André Schörner e a professora responsável e médica pneumologista Rosemeri Maurici da Silva.

Durante todo o período da pesquisa o(a) senhor(a) tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato, com algum dos pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa. A presente pesquisa está pautada na resolução 466/2012, de acordo com o CNS (Conselho Nacional de Saúde).

O(a) senhor(a) tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

Agradecemos a sua participação e colaboração.

Dra. Rosemeri Maurici da Silva  
(48) 3721-9014  
Email: rosemaurici@gmail.com

Maria Luiza Bazzo  
(48) 3721-2066  
mlbazzo@yahoo.com.br

Mara Scheffer  
(48) 3721-4562  
marascheffer@yahoo.com.br

Marcos André Schörner  
(48)3721-4562  
marcos\_schorner@hotmail.com

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina - Hospital  
Universitário - Campus Universitário Trindade - Florianópolis - Santa  
Catarina - Brasil - CEP: 88040-970

Se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) – UFSC.

Endereço: Prédio da Reitoria II, 4o andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, no 222, Trindade, Florianópolis-SC.

Telefone: (48) 3721 6094.

## **CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR**

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao trabalho e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento não serão feitas em mim. Tive tempo para tomar a decisão, bem como chance de fazer questionamentos sobre o estudo. Minhas dúvidas foram esclarecidas. Estou ciente de que posso interromper a participação no estudo a qualquer momento.



Nome do (a) participante por extenso:

---

Assinatura do (a) participante ou responsável:

---

Data:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura

do

Pesquisador:

---

Data:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nota: O presente Termo terá duas vias, uma ficará à guarda dos pesquisadores e a outra via é da posse do próprio participante da pesquisa.